

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie physico-chimique
Spécialité génétique fondamentale et Appliquée



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Biomarqueurs liées aux remodelages
musculaires dans la dystrophie musculaire de
Duchenne**

Présenté par :

Benchegra Nadjat & Hammi Sourya

Soutenu le : 30 septembre 2021

Devant le jury composé de :

Mme. Berboucha Meriem	MCA	Président
Mr. Amirouche Adel	MCA	Encadreur
Mme Ouhamed Hania	MCA	Examineur

Année universitaire : 2020 / 2021

Remerciements

Avant tout nous remercions Dieu qui nous a guidé vers le chemin du savoir et qui nous a donné la force et le courage pour arriver à terme de ce travail.

Ce projet de fin d'étude est le fruit des efforts et des sacrifices consentis par les enseignants de l'université qui ont su guider nos pas dans la voie de la recherche et de la connaissance. Nous prions Allah qu'il récompense ces nobles enseignants.

Nous sommes honorées de notre encadreur : Mr AMIROUCHE, Pour avoir accepté de diriger et de suivre de près ce travail, qui a été d'une grande aide dans sa réalisation, ses conseils et ses orientations.

Nos vifs remerciements s'adressent également à : Mme OUAHMED et Mme BERBOUCHA membres de jury pour avoir accepté de juger notre travail et de nous avoir honorées par leurs présences.

A toutes les personnes qui ont cru en nous et qui nous ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Ma famille

Mes amis

Rien n'est aussi beau à offrir que le fruit d'un labeur qu'on dédie du fond du cœur à ceux qu'on aime et qu'on remercie en exprimant la gratitude et la reconnaissance durant toute notre existence.

Je dédie ce modeste travail à ceux que j'aime :

Mon cher père Mahmoud, qui a toujours cru en moi et a mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour que je réussisse dans mes études.

Ma chère mère Malika, que je ne cesse de remercier pour tout ce qu'elle m'a

Donné. Sacrifiée pour moi et m'avoir permis d'arriver à ce stade d'éducation.

Je le dédie aussi à :

*Mes très chères sœurs Nouria, Samra, Nassima, Meriem
Mes chers frères Elhassen et sa femme Dawya, Samir et sa femme Sassia.*

*Mes nièces Rima, Sana, Chahine, Rami, Kahina, Omar,
Tarek, Badr, Thiziri, Akram, Ranim, Acil, Achraf, Hadil,
Kawther, Imenne, Wafa
A mes amis Linda, Lamia.*

Mon binôme Sourya ainsi sa famille.

A tous la promotion de génétique fondamentale et appliqué.

B.Na

Dédicace

JE dédie ce modeste travail à

À ma famille, elle qui m'a doté d'une éducation digne, son amour à fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Particulièrement À la mémoire de mon père, qui est décidé trop tôt, qui m'a toujours poussée et motivée dans mes études

A ma chère mère, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

A mes sœurs: Wardia, Smina, Salma et Dalia

A mes frères: Khaled, Mansour et Hassan

A mes oncles: Mahmoud, Mouhand et Abdrahmane et mes cousins

A mes nièces: Anaïs, Amel, elissa et Sabrinel

A mes neveux: Anis, Elyes, Mouhamed amine et Ibrahim akésil .

A mon binome: Nadjet Ainsi sa famille

A toutes mes copines

En fin, a toute les personnes qui ont contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce travail, et toute personne qui occupe une place dans mon cœur.

H .Sourya

Sommaire

Sommaire

Introduction Générale	1
Chapitre I	
Pathologie de DMD	
I-1-Définition	3
I-2-Protéine dystrophine et le complexe glycoprotéine	3
I-3-Le gène DMD	5
I-4-Mutations du gène DMD	6
I-5-Potentiel thérapeutiques	7
I-5-1- Thérapie génique	7
a-Les Adénovirus	8
b-La technique de saut d'exon	9
c-Surexpression de l'utrophine	10
d-Plasmide	11
e-Les essais cliniques	12
I-5-2-Thérapie cellulaire	13
a-Transplotation de myoblaste	13
b-Cellules AC133+	14
I-5-3-Traitement pharmacologie	14
a-Agonistes des adrénorécepteurs de type β_2	14
b-Aminoglycoside	15
c-Glucocorticoïde	16
d-Utrophine	16
Chapitre II	
Biomarqueurs musculaires	
II-1-Définition	17
II-2-Biogenèse	17
II-3-Les miARN musculaires	19

Sommaire

II-4-Rôle des miARN dans la différenciation musculaire et la dystrophie musculaire de Duchenne	20
II-4-1-Prolifération	22
II-4-2-Différenciation	22
II-4-3-Régénération	23
II-4-4-Inflammation	23
Conclusion Générale	24
Références bibliographique	

Liste D'abréviation

aa: acide aminé

AAV: Adeno-Associated Virus

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNc: ADN complémentaire

ARN: Acide ribonucléique messenger

ARNm: Acide ribonucléique messenger

Ca²⁺: ion calcium

CAD: Dystrophine Associated Protein Complex

DG: dystroglycane

DMD dystrophie musculaire de Duchenne

dystromiR micro-ARN dérégulé dans les dystrophinopathie

GFP :Green Fluorescent protein

GRMD: Golden Retriever Muscular Dystrophy

GTP: Guanosine triphosphate

HDAC: Histone désacétylase

kb/Mb: kilo/megabase

kDa: kiloDalton

Mdx: X-linked muscular dystrophy

mDYS: mini dystrophine

MEF2: myocyte enhancer factor-2

MiARN: micro ARN

myomiR: micro-ARN spécifique du muscle

nNOS: Nitrique oxyde synthase neuronale

Pax7: Paired box7

pré-miARN: precursor de miRNA

pri-miARN: transcrit primaire de miRNA

RISC: RNA-induced Silencing Complex

Liste D'abréviation

RNase III: Ribonucléase de type III

SC: cellule satellite

SRF: Serum Response Factor

Liste des tableaux

Liste des tableaux

I. Fréquences mutations du gène DMD	07
II. Profils d'expressions des miARN	22

Liste des figures

Liste des figures

1. Structure de la dystrophine et son complexe	04
2. Vecteur adénoviral.....	08
3. Principe du saut d'exon thérapeutique	10
4. Carte de l'utrophine et dystrophine	11
5. Formule des Agonistes des adrénorécepteurs de type β_2	15
6. Biosynthèse des miARN.....	19

Introduction Générale

Introduction Générale

Les dystrophies musculaires ont été décrites pour la première fois en 1860 par Charles Bell, qui a pu observer le déclin progressif des fonctions musculaires chez des patients. Ce groupe de myopathies englobe des pathologies génétiques provoquant une faiblesse de tout le système musculaire. Elles sont la conséquence d'un défaut qualitatif ou quantitatif d'une protéine : la dystrophine, ce qui entraîne la mort des tissus musculaires à plus ou moins long terme. Parmi les neuves dystrophies musculaires humaines recensées à ce jour, la Dystrophie musculaire de Duchenne est la plus sévère et courante. Elle doit son nom au neurologue français Guillaume Duchenne, qui observa ces atteintes musculaires chez 13 garçons à la fin du XIX^{ème} siècle (**Thomas, 2019**).

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie mortelle liée au chromosome X causée par des mutations dans le gène de dystrophine qui code pour une protéine du cytosquelette, la dystrophine. Ce gène a une très grande entité de 2,5 millions de paires de bases, qui peut être le siège de plusieurs types d'altérations mutationnelles : mutations ponctuelles, duplications partielles et, surtout, larges délétions intragéniques représentant près de 70% des anomalies chez les patients DMD (**Leturcq et Kaplan, 2005**). L'absence de la dystrophine entraîne une dégénérescence progressive des muscles squelettiques et cardiaques avec remplacement du tissu fibreux, infiltration graisseuse et décès précoce subséquent par insuffisance respiratoire ou cardiaque. Cette pathologie est la plus fréquente des dystrophies musculaires, touchant principalement les garçons, car ils ne possèdent qu'un chromosome X, tandis que la femme en possède deux ainsi si chez elle, l'un de ces chromosomes porte le gène DMD, elle ne sera pas malade car elle en possède un autre, elle sera porteur sain. Cette dernière se manifeste par des symptômes apparaissant entre 3 et 5 ans. Alors que les progrès des soins médicaux ont permis aux patients atteints de DMD de vivre jusqu'à l'âge adulte (**Guiraud et al., 2015**).

Pour réussir à traiter la dystrophie musculaire de Duchenne, les chercheurs ont développé des pistes thérapeutiques complémentaires ciblant la maladie à différents niveaux, qui sont la thérapie génique dans le but de pallier l'altération du gène, la thérapie cellulaire pour apporter de nouvelles cellules musculaires, et enfin les traitements pharmacologiques pour remplacer la protéine déficitaire.

Le caractère progressif de la DMD suggère que des mécanismes endogènes pourraient être recrutés pour atténuer les dommages causés par la DMD et pour maintenir la capacité de régénération des muscles squelettiques. Cela peuvent soutenir que les mécanismes

Introduction Générale

moléculaires endogènes les plus attrayants seraient ceux qui renforcent la capacité de régénération des muscles squelettiques et confèrent aux fibres musculaires la capacité de surmonter la fibrose et l'inflammation résultant de la perte de la dystrophine (**Chang et al., 2016**). À cet égard, les microARN ont retenu l'attention en tant que molécules candidates pour modifier la pathologie DMD en raison de leurs fonctions dans les muscles squelettiques normaux et malades et la facilité relative avec laquelle ils peuvent être emballés dans des vecteurs (**Horak et al., 2016**). Ces petits ARN non codants omniprésents ont une longueur d'environ 22 nucléotides et affectent un large éventail de processus cellulaires en inhibant la traduction des ARNm cibles (**Meister, 2013 ; Ha & Kim, 2014**).

C'est dans ce sens que s'insère notre étude, qui comporte trois volets principaux :

- Le premier chapitre se divise en deux parties :
 - ✓ La première partie : présentation générale de la maladie de dystrophie musculaire de Duchenne, le gène DMD, la complexe glycoprotéine, et les différentes mutations qui causent cette maladie.
 - ✓ La deuxième partie : basée sur les stratégies thérapeutiques pour la DMD tels que la thérapie génique, thérapie cellulaire, et traitements pharmacologiques.
- Le second chapitre : sera centrée sur les miARN et leur biogenèse, et enfin les miARN musculaires.
- Le troisième chapitre : il sera fait une comparaison sur les profils d'expression des miARN dans le muscle et les profils d'expression des miARN dans la DMD.

Enfin, une conclusion générale, récapitulera les principaux axes de cette étude.

Chapitre I
Pathologie de DMD

I-1-Définition

La myopathie de Duchenne ou dystrophie musculaire de Duchenne est une maladie génétique, récessive et progressive liés au chromosome X qui dégénère les fibres musculaires avec une prévalence d'environ 1 sur 3500 (**Emery, 1991**). Elle se déclare seulement chez les garçons et entraîne une perte de la capacité à marcher au cours de l'enfance (**Chelly et Kaplan, 1988**). Cette dernière se complique par une insuffisance respiratoire et/ou cardiaque qui conduit au décès vers l'âge de 20 ans (**Serratrice et al., 1997**). L'espérance de vie des patients atteints de DMD s'allongent de 19 ans à 30 ans en cas de ventilation assistée, quelle soit invasive ou non (**Landfeldt et al., 2020**). Cette maladie est décrite en 1868 par Duchenne de Boulogne (**Chelly et Kaplan, 1988**) et fait partie des maladies dite « orphelins » (**Bussel et Raphael, 2002**) qu'est causée par des mutations de Novo (spontané) du gène de la dystrophine qui code par une protéine cytosquelette de 427 KDA appelée dystrophine (**Blake et al., 2001**). La dystrophine joue un rôle important dans la structure des cellules musculaires. Son absence entraîne une fragilité structurelle et une accumulation cytoplasmique de protéines normalement absentes des fibres musculaires (**Straub et Campbell, 1997**). Et une délocalisation des protéines associées à la dystrophine de la membrane et une déstabilisation des costamères, conduisant à une fragilité de la membrane (**Rybakova et al., 2000**).

I-2-Protéine dystrophine et le complexe glycoprotéine

La découverte de la dystrophine en tant qu'agent causal de la DMD a incité les chercheurs à se pencher sur les protéines partenaires associées. Plusieurs études, menées dans ce domaine, ont révélé le complexe protéique détaillé associé à la dystrophine dans les tissus normaux ainsi que dans les tissus dystrophiques (**Sweeney et Barton, 2000**). Tous ces grands complexes macromoléculaires de protéines sont collectivement appelés Dystrophine Associated Protein Complex (CAD) (**Bhattacharya, 2015**), dit d'échafaudage, qui traverse la membrane et lie le cytosquelette d'actine à la lame basale de muscle (**Ohlendieck et al., 1993**). Le CAD joue un rôle important dans les dystrophies musculaires puisque les mutations dans ces diverses protéines peuvent conduire vers d'autres formes de dystrophies musculaires (**Cohn et Campbell, 2000**). Le CAD est composé entre autres, de la dystrophine, de dystroglycans (α - et β -DG), de sarcoglycans (α -, β -, δ -, ϵ -, γ -), de sarcospan, de syntrophines (α -1, β -1 et β -2) et de dystrobrevines. Suite à des recherches immunohistochimies, ils ont déterminé qu'il y a une diminution considérable ou une absence

complète des protéines du CAD dans le sarcoplasme des patients atteints de DMD, Cette diminution importante est le résultat de l'absence de dystrophine(Blain,2008). La localisation au sarcoplasme des protéines du CAD est aussi affectée, bien que ces protéines soient transcrites et traduites. L'absence de lien physique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule musculaire rend le sarcoplasme fragile, rendant les fibres musculaires susceptibles à la dégénérescence au cours des cycles répétés de contraction et de relaxation du muscle (Mastrumura et al., 1994).

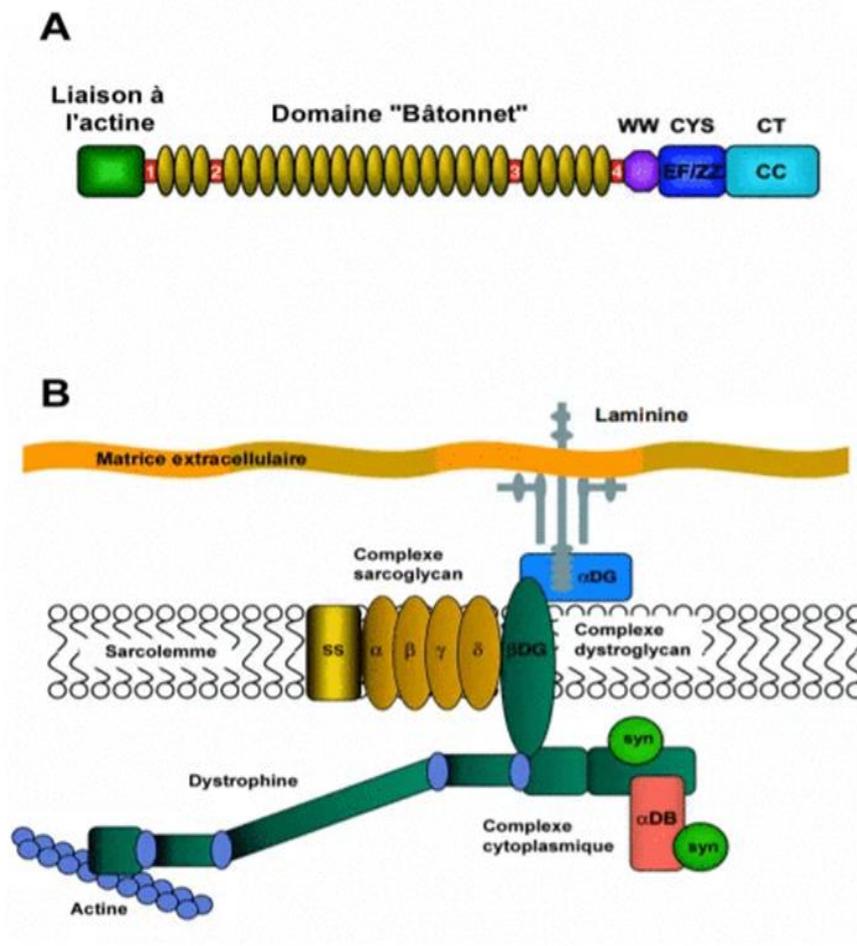


Figure 1 : Structure de la dystrophine et son complexe. Les différents domaines de la dystrophine sont montrés(A). Le complexe de la dystrophine et ses divers constituants(B) (Blake et al., 2002).

Il a été démontré que les fibres de petit diamètre (type I, IIA) sont moins nécrosées que les fibres musculaires de grand diamètre (type IIB) (Boland et al., 1995). De plus, la dégénérescence continue des muscles nécessite leur régénération quasipermanente épuisant les stocks de cellules satellites nécessaires (Heslop et al., 2000). Les cellules satellites sont des cellules progénitrices musculaires mononucléées qui restent latentes dans une niche entre le sarcolemme et la lame basale des myofibre (Carlson et al., 2003). Les patients perdent leur capacité de régénération et la dégénérescence musculaire ne peut être enrayée (Price et al., 2007). Le calcium aurait également un rôle important dans la nécrose des cellules musculaires. En effet, une accumulation de calcium a été observée dans des fibres musculaires de patients DMD (Bodensteiner et Engel, 1978) et un influx massif de calcium a été démontré à travers des membranes déficientes en dystrophine (De Backer, 2002). Dans un premier temps, le mécanisme d'homéostasie calcique compense cet apport de calcium, mais lorsque des micro lésions apparaissent dans le sarcolemme, l'homéostasie ne suffit plus et la concentration intracellulaire de calcium augmente (Tinsley et al., 1998). Des protéases, dont les calpaïnes, sont alors recrutées, détruisant les protéines membranaires et conduisant à une entrée massive de Ca^{2+} et à la mort cellulaire. (Maiga, 2018).

I-3-Le gène DMD

L'identification du gène DMD sur le chromosome X a été le premier triomphe du clonage positionnel et a ouvert une nouvelle ère dans la recherche sur la DMD. Ce dernier est le plus grand gène connu, représente 0.1% du génome humain et est situé sur le bras court du chromosome X (locus Xp21.2) couvrant 2.5 Mb de séquence génomique. Il est composé du 99% du gène d'intron et de 79 exons codant par l'ARNm de 14 Kb. (Koenig, 1987), de pleine longueur transcrit à partir du locus DMD s'est avéré être principalement exprimé dans le muscle squelettique et cardiaque avec de plus petites quantités dans le cerveau et couvrait une grande région génomique de produit protéique codé par ce transcrit a été nommé dystrophine. Ce gène code pour différentes isoformes de dystrophines ; dont trois pleines longueurs (full length dystrophin) et quatre séquencés courtes (short isoforme) (Koenig, 1987 ; Monaco et al., 1987). Le gène de la dystrophine est composé de sept promoteurs spécifiques, ainsi sa transcription est contrôlée par trois promoteurs régulés indépendamment qui sont nommés les promoteurs de cerveau(B), du muscle(M) et de Purkinje(P), localisés en amont du premier exon spécifique selon leur principale site d'expression qui s'associe en suite à 78 autres exons, soit un total des 79 exons (Koenig et al., 1989).

I-4-Mutations du gène DMD

La dystrophinopathie de Duchenne est due à des mutations qui conduisent des défauts quantitatifs et/ou qualitatifs de l'expression de la dystrophine dans un tiers des cas, le gène DMD contribue à un taux relativement élevé de mutation de novo spontané. Il existe ; en fait plus de 4700 mutations différentes regroupées en 3 principales catégories : délétion d'un ou plusieurs exons, duplication d'un ou plusieurs d'exons et les mutations ponctuelles. Les larges délétions au niveau du gène de la dystrophine sont responsables de la manifestation du phénotype dystrophique chez 65% des cas, la taille de ces délétions est très variable. Elle vas de 6 à 2000 Kb (**Baumbach et al.,1989**). Ces dernières se produise n'importe ou dans le gène ou se trouve 2 points chauds, le premier point dans la partie central du gène (70%) qui se situe en région médiane 3' et en région 5' entre les exons 45 et 55 avec un point de cassure dans l'intron 44, et l'autre point dans la région 5' entre les exons 2 et 19 des points de cassures dans l'intron 7(**Leturcq et kaplan, 2005; Oshima et al., 2009**). En suite les duplications partielles du gène DMD sont responsables de 5-10% des mutations qui provoquent une dystrophie musculaire de duchenne, elle se comporte comme des exceptions à la règle du cadre de lecture, leur fréquence soit plus élevée à l'extrémité 5' du gène (80% contre 20% dans la région centrale), notamment la duplication de l'exon 2, altération la plus communément identifiée (**White et al.,2006**). Elles sont pour conséquence l'absence complète de la protéine au sarcoplasme musculaire chez plusieurs patients atteints de DMD et chez plusieurs modèles animaux incluant la souris *mdx* (**Prelle et al., 1993**). En résumé les duplications sont les résultats probables d'une recombinaison, homologue ou non (**Gilgenkrantz, 1990**). Enfin les mutations ponctuelles de tous types affectant l'ensemble du gène DMD par la conversion d'un codon pour un aa en un codon d'arrêt ce qui entrainera également une terminaison prématurée de la traduction des protéines (mutation non sens). Presque toutes ces mutations conduisent à des protéines tronquées qui ont toujours le même raisonnement lié à la perte ou le maintien du cadre de lecture de la traduction (**Roberts et al., 1992**).

Tableau I : Fréquences des mutations du gène DMD (Robert et al., 1994)

DMD
65% délétions et duplications de grandes taille
18% petites mutations non-sens (à l'origine d'un codon stop)
8% petites délétions et insertions (de moins de 52 paires de bases)
7% petites mutations d'un site d'épissages
<2% petites mutations faux-sens (substitution de nucléotides)

I-5-Potentiel thérapeutiques

Les thérapies développées dans le cadre des myopathies, notamment de la DMD, peuvent contenir au moins l'un des effets thérapeutiques suivant : ralentir, voire arrêter la dégénérescence musculaire; estomper les divers signes cliniques en corrigeant l'origine de la pathologie; restaurer la capacité musculaire des patients. Presque 150 ans se sont écoulés depuis la description des premiers cas de DMD (**Stéphan, 2007**) et presque 20 ans depuis que le gène codant pour la dystrophine fut identifié (**Keskas, 2012**). Néanmoins, il n'existe pour l'instant aucun traitement curatif pour cette maladie. La difficulté à établir une thérapie efficace est particulièrement due aux obstacles représentés par le remplacement ou la réparation du gène défectueux.

I-5-1- Thérapie génique

Consiste à introduire un ou plusieurs gènes d'intérêt à l'intérieur des cellules d'un organisme en utilisant différents vecteurs. Le but thérapeutique dans le cadre de la DMD est d'introduire une copie fonctionnelle du gène de la dystrophine dans les fibres musculaires malades afin d'en restaurer leur fonction perdue. Des obstacles restent encore à franchir avant de pouvoir envisager d'appliquer efficacement cette technique à l'homme. Des problèmes comme la très grande taille du gène de la dystrophine ce qui le rend difficile à transporter par un vecteur (**Bensghir, 2006**).

a-Les Adénovirus

Sont des virus non enveloppés à ADN double brins d'environ 38 kb et font 90 à 100 nm de diamètre. Une partie des gènes adénovirus impliqués dans la réplication virale peuvent être supprimées afin de libérer de la place au transgène d'intérêt. Les adénovirus de première génération ont permis de délivrer la mDYS (dystrophine tronquée ayant les parties C et N terminales intactes) dans des muscles de souris mdx (**Ragot et al., 1993**). L'injection d'adénovirus montre toujours de meilleurs résultats chez des souris nouveau-nées que dans des souris adultes (**Acsadi et al., 1994**). Cela s'explique par le fait que le système immunitaire de la souris nouveau-née n'est pas encore entièrement mature. Ce dernier a aussi été testé chez le chien GRMD où l'expression de la mDYS a pu être observée, mais également une réponse immunitaire a été observée contre l'adénovirus (**Howells et al., 1998**). De ce fait, des constructions adénovirales ne contenant plus de gènes viraux ont été développées. En enlevant ces gènes, la capacité d'encapsulation a par ailleurs augmenté pouvant ainsi permettre d'y inclure la FLDYSe. Des injections d'adénovirus codant pour la FLDYS de souris ont alors été faites dans la souris mdx nouveau-née. Elles permirent d'obtenir l'expression de cette dystrophine dans 50% des fibres et ce jusqu'à 1 an après l'injection du virus (**Dudley et al., 2004**). Même si cette expression est stable durant un an, mais ne savent pas ce qu'il adviendra à plus long terme lorsqu'administré à un patient dystrophique. De plus, l'utilisation du vecteur adénoviral est compliquée vu que la moitié de la population humaine possède déjà des anticorps contre la capsid de l'adénovirus (**Zaiss et al., 2009**).

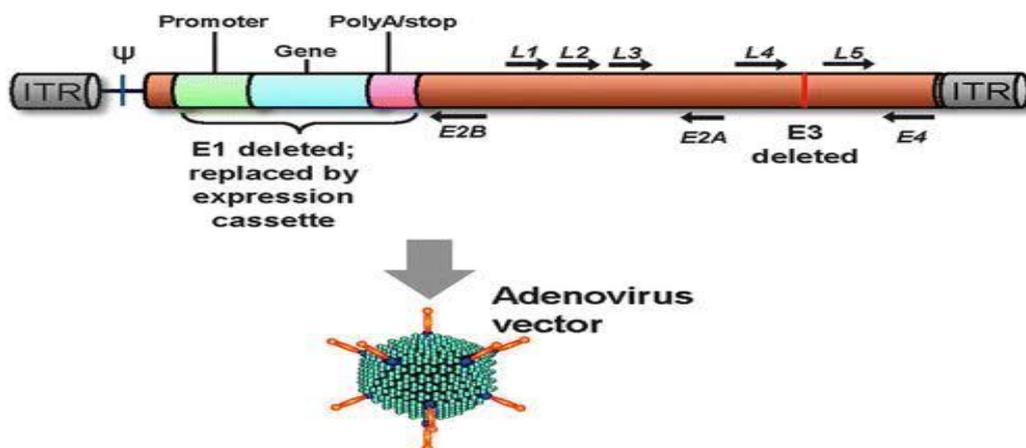


Figure 3 : Le vecteur adénoviral (**Crystal ,2014**)

b-La technique de saut d'exon

De nombreux cas de DMD sont dus à des délétions de un ou de plusieurs exons qui provoquent un changement de cadre de lecture (**Koenig et al. , 1989**), et qui aboutissent à la synthèse d'une dystrophine non fonctionnelle. Il est possible de rétablir ou de restaurer ce cadre de lecture en retirant artificiellement un ou plusieurs exons de gène de dystrophine pour générer une dystrophine sous une forme tronquée ; mais fonctionnelle dans le contexte d'une thérapie pour la DMD, cette technique est appelée saut d'exon ou *exon skipping* (**Mann et al. ,2001 ; Bremmer-Bout et al., 2004**).

Elle est possible grâce à l'utilisation de petits ARNs artificiels anti-sens qu'on appelle oligonucléotide anti-sens qui est d'environ 20 nucléotides, dont les séquences sont conçues de façon à ce que l'appariement ne se fasse qu'avec la séquence complémentaire correspondent à l'exon à éliminé. Ces derniers ont la capacité de masquer les sites d'épissage du ou des exons bornant la mutation lors de la réaction d'épissage de l'ARN pré-messager (**Lu et al., 2005 ; Luet al., 2003**), la suppression des exons ciblés lors de l'épissage alternatif par les oligonucléotides anti-sens, une restauration efficace et durable de la synthèse de dystrophine et leur expression reste stable après un mois de l'injection intramusculaire ou intra-artérielle du vecteur viral l'AAV chez la souris mdx (**Goyenvalle et al.,2004**) (la souris *mdx* c'est le modèle animal le plus utilisé dans la DMD (**Bulfield et al.,1984**) lors de recherche pour expliquer les mécanismes de bris des fibres musculaires,pour des essais de transfert de myoblastes et pour des essais de thérapies géniques visant a rétablir l'expression de tout ou une partie de la dystrophine (**Nguyen ,2001**)et caractériser par une mutation qui est la transversion d'un nucléotide C en un T dans l'exon 23 du gène de la dystrophine, cette mutation convertie le codon glutamine CAA en codon stop TAA(**Chamberlain ,2002**).

Saut d'exon sur des souris modèles Duchenne

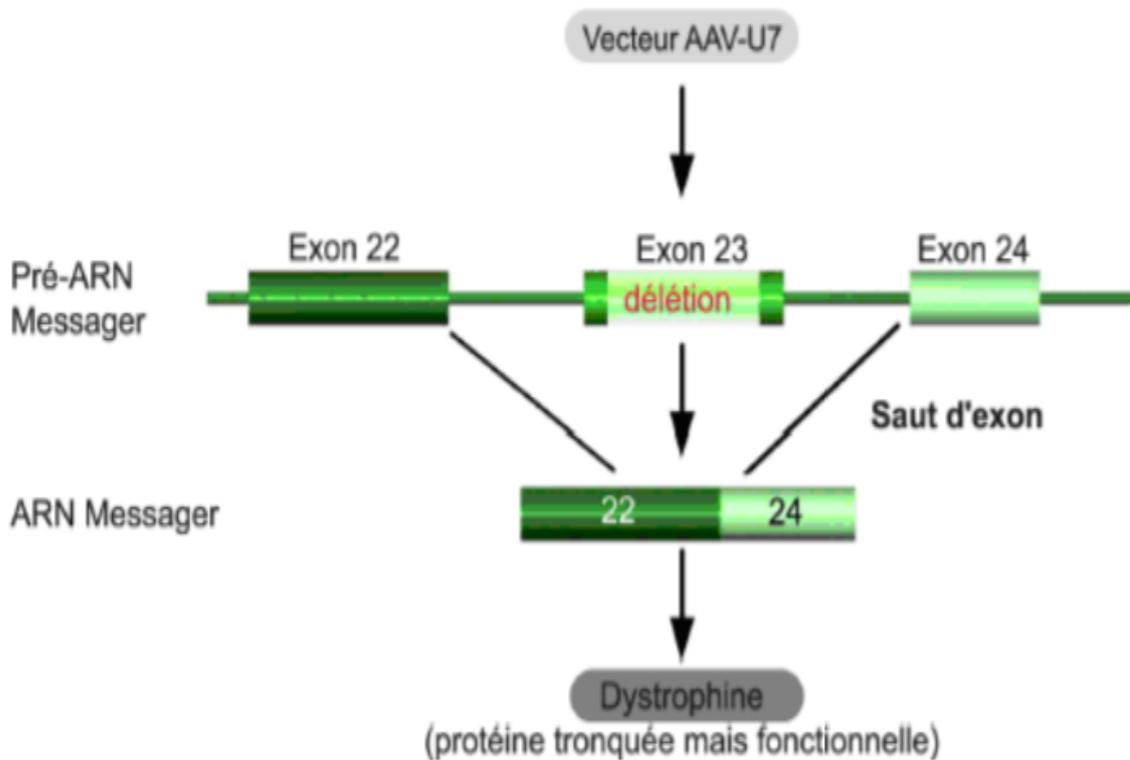


Figure 3 : Principe de saut d'exon thérapeutique (AFM-Genethon, 2004).

c-Surexpression de l'utrophine

L'utrophine est la protéine autosomique homologue de la dystrophine, dont il a été démontré qu'il partage une séquence élevée et une similarité structurale avec la dystrophine (**Blake et al., 2002; Love et al., 1989**). Au cours des techniques de transfert de gènes d'utrophine, des gènes d'utrophine pleine longueur ou mini sont transférés vers le muscle DMD à l'aide de vecteurs AAV pour stimuler son expression. Il a été démontré que de telles stratégies stimulent l'expression de l'utrophine et améliorent le phénotype dystrophique chez les souris mdx (**Odom et al., 2008 ; Deol et al., 2007**). L'un des principaux avantages de l'utilisation des thérapies géniques à base d'utrophine par rapport aux thérapies géniques à base de dystrophine est que la délivrance de gènes d'utrophine minimise le risque de réaction

immunitaire puisque l'utrophine est naturellement exprimée dans le muscle dystrophique. Cependant, l'approche de transfert de gènes d'utrophine est confrontée à quelques limitations impliquant une mauvaise absorption cellulaire, une efficacité variable dans différents tissus et élimination rapide du corps (Fairclough et al., 2011).

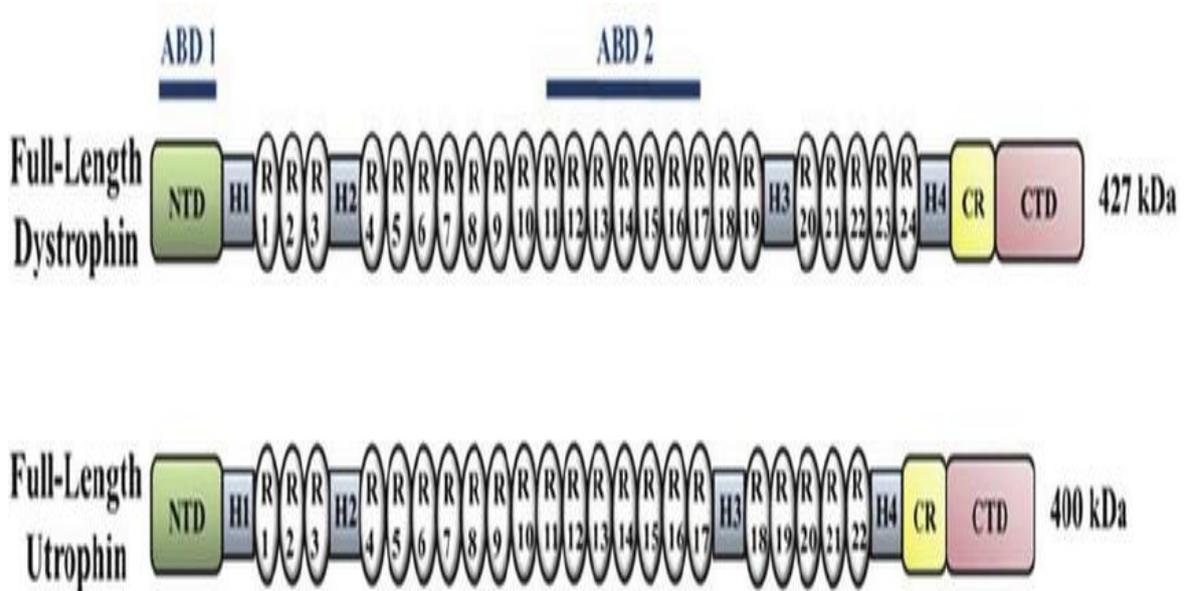


Figure 4: Carte de l'utrophine et dystrophine (Gintjee et al., 2014).

d-Plasmide

L'injection de plasmides contenant le gène de la dystrophine n'a pas permis d'observer l'expression de la dystrophine que dans 1% des fibres musculaires (Acsadi et al., 1991). L'électrotransfert de plasmides, contenant un gène rapporteur, à l'intérieur des muscles de souris mdx, a permis d'obtenir une expression atteignant 40% des fibres (Vilquin et al., 2001). Cette expression a été prolongée à plus de 10 semaines sous une immunosuppression transitoire ou soutenue, comparée à une expression de 3 semaines sans immunosuppression. Dans cette même étude, un plasmide de grande taille contenant le gène de la dystrophine en fusion avec le gène de l'eGFP (enhanced green fluorescent protein) a été électrotransféré à l'intérieur de muscles de souris mdx. Cette technique nécessite par contre des injections répétées de plasmides pour une expression à très long terme et est limitée par son accès à certains muscles (Huard, 1998).

e-Les essais cliniques

Les virus adéno-associés (AAV) et leur forme recombinante (rAAV) sont donc les vecteurs viraux actuellement utilisés pour les essais thérapeutiques. Ils ont montré une bonne efficacité en produisant des gènes stables dans différents modèles animaux (**Herzog, 1999**), ainsi qu'une faible réponse immunitaire de la part de l'organisme hôte (**Mann, 2003**). Cependant, de nouveaux essais thérapeutiques montrent une réponse immunitaire chez les patients (**Mendell et al., 2010 ; Wang, 2010**) et posent un nouveau problème. Des immunosuppresseurs peuvent être utilisés pour empêcher cette réponse immunitaire (**Wang, 2007**), mais la cause de cette réponse immunitaire est encore incertaine. Il est possible que la dystrophine elle-même déclenche cette réponse immunitaire chez les patients. En effet, l'essai clinique de phase I réalisé par Mendell et ses collaborateurs, ont mis en évidence une réponse immunitaire différente et dose dépendante selon les capsides virales utilisées ainsi qu'une activation des lymphocytes T spécifique à la dystrophine chez certains patients (**Mendell et al., 2010 ; Bowles, 2012**).

Un essai de phase I de thérapie génique est en cours chez l'homme depuis septembre 2000 dans la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Les malades doivent recevoir une injection intramusculaire d'ADN contenant la séquence codante de la dystrophine. L'étude se déroule à l'Institut de Myologie (Paris), en collaboration avec la société Transgène. Après avoir testé plusieurs méthodes de transfert de gènes sur des souris et des chiens dystrophiques, il a été décidé d'utiliser tout l'ADNc du gène d'une dystrophine de pleine longueur emballé dans un plasmide servant de vecteur en compagnie d'un puissant promoteur tiré d'un virus. Les plasmides présentent l'avantage de ne contenir aucune protéine et ne devraient donc provoquer aucune réaction immunitaire. Le gène thérapeutique à transporter n'a pas non plus de protéine, c'est de l'ADN pur, ou nu. D'autres essais préliminaires, avec des cultures de cellules musculaires et des souris, ont montré que ce vecteur donnait naissance à la nouvelle dystrophine à l'endroit correct, sous la membrane de la cellule musculaire des animaux, qu'il restaurait le complexe dystrophine-glycoprotéine et qu'il prolongeait la vie des cellules (**Klein et Jaeger, 2001**).

De nombreux essais à base de mini-/micro-dystrophines ont été menés et/ou sont encore en cours (**Hakim et al., 2017**) respectivement par les laboratoires Pfizer, Sarepta Therapeutic, Solid Bioscience, avec utilisation de sérotypes AAV9 ou AAVrh74 à des doses élevées de vecteurs, allant de 1×10^{14} à 3×10^{14} copies de génome viral/kg (**Fortunato et al., 2021**) et

enfin Généthon. L'essai récent mené par les équipes de Généthon utilise une dose un log plus faible (1013). La première injection a eu lieu en avril 2021. Sept centres seront ouverts en France, au Royaume-Uni, aux États-Unis ; Les essais thérapeutiques en cours et à venir permettront d'établir l'efficacité de la transduction obtenue, de déterminer la meilleure composition possible du transgène, de prouver l'impact clinique de la protéine produite, et d'évaluer la sécurité de ces procédures (**Lagrue et al., 2021**).

Le développement de thérapie génique est plus avancé, les traitements visant à réintroduire une copie fonctionnelle de la dystrophine, ou à rétablir son expression à partir de la copie endogène, seraient idéaux. L'enseignement majeur issu de multiples essais cliniques conduits ces dernières années, aux mieux ralentissent l'évolution de la maladie de Duchenne.

I-5-2-Thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire est l'une des stratégies clé pour le futur traitement des dystrophies musculaires de Duchenne pour la réparation du muscle qui ont leurs propres cellules souches, les cellules satellites (SC) ou myoblastes, qui durant le développement ou la restauration des muscles, fusionnent les unes avec les autres pour donner des myotube, puis de longue fibre musculaire (**Daniel et Jacques, 2016**). Cette thérapie à pour restaurer la dystrophine en autant des myofibres qui est nécessaire pour arrêter la dégénérescence musculaire et fournir de nouvelles cellules capable de maintenir la capacité de régénération de muscle.

a-Transplotation de myoblaste

Le principe général de cette thérapie est de transplanter des myoblastes dans les muscles dystrophiques, ces cellules vont pouvoir ensuite fusionner avec les fibres musculaires malades et créer de nouvelles fibres qui expriment la dystrophine (**Partridge, 1991**). Les myoblastes sont des cellules qui existent à l'état normal autour d'une fibre musculaire et dont le rôle est de réparer le muscle en cas de dommage. Le but de cette thérapie est de créer une nouvelle fibre musculaire hybride qui est faite de la fusion de la fibre musculaire malade et des myoblastes normaux (**Huard et al., 1993**). En effet après administration, il a été observé une restauration de l'expression de la dystrophine. Par la suite, plusieurs essais cliniques ont été réalisés concernant une greffe de myoblastes humains, mais l'efficacité du traitement s'est avérée être limitée. En cause, une mortalité très importante des cellules greffées, autour de 90%, et ce, dans les 24 heures suivant l'injection. Plus récemment, il a

été montré qu'une amplification *in vitro* des myoblastes humains réduisait leur potentiel myogénique et réduisait également leur migration. Il y a actuellement un essai clinique en cours au Canada, en phase I/II de transplantation de myoblastes humains chez 10 enfants atteints de DMD de plus de 16 an(Thomas,2019).

b-Cellules AC133+

Les cellules AC133+ ce sont des cellules du sang exprimant CD133 (un marqueur de surface présent dans les cellules souches et progénitrice), ces cellules sont alors capables de former des myotubes *in vitro* et d'exprimer à leurs surfaces des marqueurs de cellules myogéniques (. Des injections intramusculaires et intra-artérielles faites chez des souris mdx ont démontré que ces cellules étaient capables de se fusionner avec les fibres musculaires de l'hôte (Torrente et al., 2004). Par la suite, des cellules AC133+ furent isolées à partir de biopsie musculaire et montrèrent les mêmes capacités que celles issues du sang (Negroni et al., 2009). Un essai clinique de phase I a même été réalisé sur des patients DMD. Bien qu'aucune toxicité due à ces cellules ne fût détectée, aucune amélioration phénotypique ne fut retrouvée chez ces patients (Torrente et al., 2007).

Malgré les expériences thérapeutiques essayées au niveau cellulaire, et les nombreuses recherches qui sont entamé. Les thérapies cellulaires ne sont pas arrivées aux résultats satisfaisants.

I-5-3-Traitement pharmacologie

Les premiers essais pour améliorer les conditions de vie des patients souffrant de la DMD ont impliqué l'utilisation de médicaments visant à ralentir la progression de la maladie. Bien qu'il n'existe aucune thérapie pharmacologique à ce jour contre la DMD.

a-Agonistes des adrénorécepteurs de type β_2

Les muscles des patient DMD ont une force nettement réduite ce qui laissait suggérer l'utilisation de diffère médicaments dans le but d'améliorer leur force musculaire. L'utilisation de clenbuterol un agoniste des adrénorécepteur β_2 chez la souris mdx qui a montré un effet positif (Zeman et al., 1994). En effet les résultats obtenus ont montré que le Clenbuterol un traitement à long terme qui permettait d'améliorer la croissance et la régénération musculaire. Malgré leur inconvénient du développement de malformation et d'une fatigue prématurée (Dupont-versteegden et al., 1995). D'autres études ont démontré

que l'utilisation de ce médicament réduisait le niveau de dégénérescence musculaire chez les souris dystrophiques âgées (**Zeman et al., 2000**). Le formotérol c'est un autre agoniste a été décrit comme étant plus efficace que la Clenbuterol, car il était capable d'induire une amélioration de la fonction musculaire chez la souris *mdx* tout en abaissant l'activité du protéasome, ce qui a permis d'augmenter la masse et la taille des fibres dans plusieurs muscles (**Harcourt et al., 2007**).

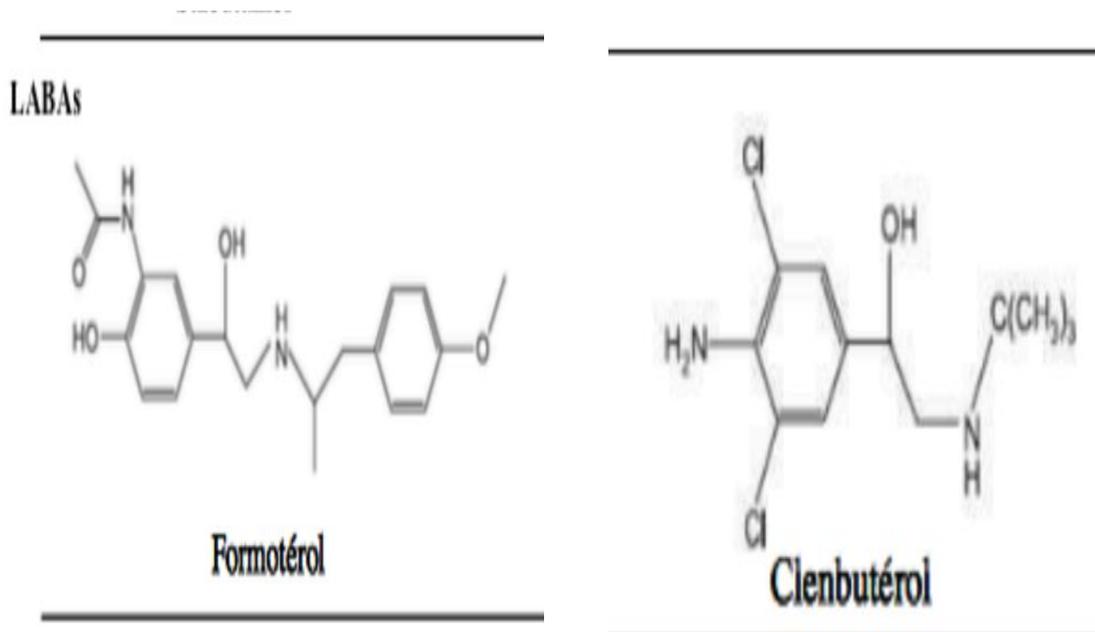


Figure 5: La formule des Agonistes des adrénorécepteurs de type β_2 (**Joassard, 2013**)

b-Aminoglycoside

Les aminoglycosides sont la seule approche pharmacologique qui peut corriger le déficit musculaire. Ces antibiotiques sont des médicaments ayant la capacité de permettre aux polymérases de continuer la traduction du gène au-delà d'un codon stop. Grâce à cette propriété, l'administration de ce médicament pourrait restaurer la production de dystrophine chez 10 à 15% des patients DMD. Ceux porteurs d'une mutation non-sens dans le gène de la dystrophine. Chez les souris *mdx*, l'administration de cet antibiotique assure une protection contre les cassures musculaires grâce à la restauration de la dystrophine pleine longueur sous la membrane des muscles squelettiques. Cette molécule est ainsi en voie de développement en essayant d'améliorer son efficacité et de minimiser sa toxicité (**Barton-Davis et al., 1999 ; Vinod et al., 2010**).

c-Glucocorticoïde

Les glucocorticoïdes, tels que la prednisone, c'est le seul traitement prescrit en routine aux garçons atteints par la maladie de Duchenne (**Maïté, 2002**). Cette molécule visait à réduire l'inflammation chronique des muscles des patients DMD et l'augmentation de la force musculaire (**Stéphan, 2007**). Malheureusement, ce traitement génère beaucoup d'effets secondaires, c'est pourquoi les recherches se sont tournées vers ses dérivés comme le déflazacort, qui provoque moins d'effets secondaires indésirables mais qui est aussi moins bénéfique aux muscles (**Campbell et Jacob, 2003**).

d-Utrophine

Plusieurs composés pharmacologiques ont été utilisés pour réguler à la hausse l'expression de l'utrophine dans le muscle, notamment l'héréguline, la L-arginine, le SMT C1100 et les activateurs du programme myogénique lent. L'héréguline est un facteur trophique dérivé du nerf qui stimule la transcription de l'utrophine dans le muscle (**Khurana et al., 1999 ; Gramolini et al., 1999**). De plus, le traitement à l'héréguline chez les souris mdx s'est avéré à améliorer le phénotype dystrophique (**Krag et al., 2004**). Des études récentes ont montré que le SMT C1100, un composé synthétique, augmente l'expression de l'utrophine A dans le muscle, augmente la force musculaire globale et améliore le phénotype dystrophique chez les souris mdx (**Tinsley et al., 2011**). Le SMT C1100 est actuellement testé dans des essais cliniques et il a été signalé qu'il était le premier modulateur de l'utrophine à entrer dans les essais cliniques (**Ricotti et al., 2016**).

Les études de traitements pharmacologiques menées jusqu'à présent sont pléthoriques et il est difficile de retirer une vision claire des traitements à fort potentiel. Cela vient en partie du fait que les effets de l'absence de dystrophine sont complexes et non encore clairement élucidés.

Chapitre II

Biomarqueurs musculaires

Pendant longtemps, les ARN étaient considérés comme de simples intermédiaires entre l'ADN et les protéines. Mais depuis les années 1990, une nouvelle classe de petits ARN non codants a été découverte, les micro-ARN (miARN). Il s'agit d'ARN simple brin de 21 à 25 nucléotides capable de se fixer sur les ARNm pour moduler leur expression (**Lee et al., 1993**). Les miARN sont une nouvelle classe de régulateurs géniques puisqu'il a été estimé à plus de 60% des gènes humains codant pour des protéines qui seraient régulés par des miARN (**Friedman et al., 2009**).

II-1-Définition

Les microARN constituent une large famille de petits ARN simple brin non codants présents dans la grande majorité des organismes vivants. Ils régulent l'expression génique de manière post-transcriptionnelle, soit en inhibant la traduction de l'ARN messager, soit en provoquant sa dégradation (**Perrine, 2015**). Ils ont été découverts par hasard en 1993 dans le laboratoire du Dr. Ambros sous le nom de petits ARN temporels (**Lee et al., 1993**). Les miARN sont désignés par le préfixe "miR" et par un numéro d'identification, avec également la mention de l'espèce concernée (par exemple : "hsa-miR-101" pour le miARN 101 chez *Homo sapiens*) (**Bret et Schved, 2009**).

II-2-Biogenèse

La biogenèse des miARN est un processus cellulaire qui se déroule en plusieurs étapes délimitées dans les compartiments cellulaires que sont le noyau et le cytoplasme. La synthèse des miARN commence par leur transcription par l'ARN polymérase II dans le noyau des cellules (**Lee et al., 2004**). Les longs transcrits primaires ainsi créés sont appelés pri-miARN (pour primary-miRNAs) et sont coiffés en 5' et polyadénylés en 3' (**Cai et al., 2004**). Les pri-miARN et plus spécifiquement les structures en tige boucle sont alors pris en charge par l'endonucléase nucléaire (RNase III) Drosha, dont le rôle est de découper le pri-miARN afin de libérer les tiges boucles pour former des pré-miARN (pour precursor-miRNA), d'environ 80 nucléotides (**Fortin et al., 2002**). Les pré-miARN sont ensuite transférés du noyau vers le cytoplasme à l'aide de l'Exportin-5 et de son partenaire Ran-GTP. Cet export s'effectue au travers des pores nucléaires, des complexes protéiques attachés à la membrane nucléaire. Il semblerait également que le rôle de l'Exportin-5 ne se limite pas à l'export des pré-miARN uniquement mais aussi à la stabilité générale de ces derniers (**Bohnsack et al., 2004**).

Une fois dans le cytoplasme, les pré-miARN sont clivés par la nucléase Dicer-1 pour former des duplexes de miARN double brin (Bernstein *et al.*, 2001; Ketting *et al.*, 2001). Les duplexes sont alors séparés par une hélicase encore non identifiée pour former deux miARN matures d'environ 20 nucléotides (Mourelatos *et al.*, 2002). Le miARN mature, qui est la partie active du précurseur, va être chargé dans un complexe appelé RNA-induced silencing complex (RISC) alors que le miARN complémentaire inactif va être dégradé (Liu *et al.*, 2004 ; Meister *et al.*, 2004). Le miARN mature associé avec l'unité RISC permettra sa fixation sur son ARNm cible (Iorio *et Croce*, 2012).

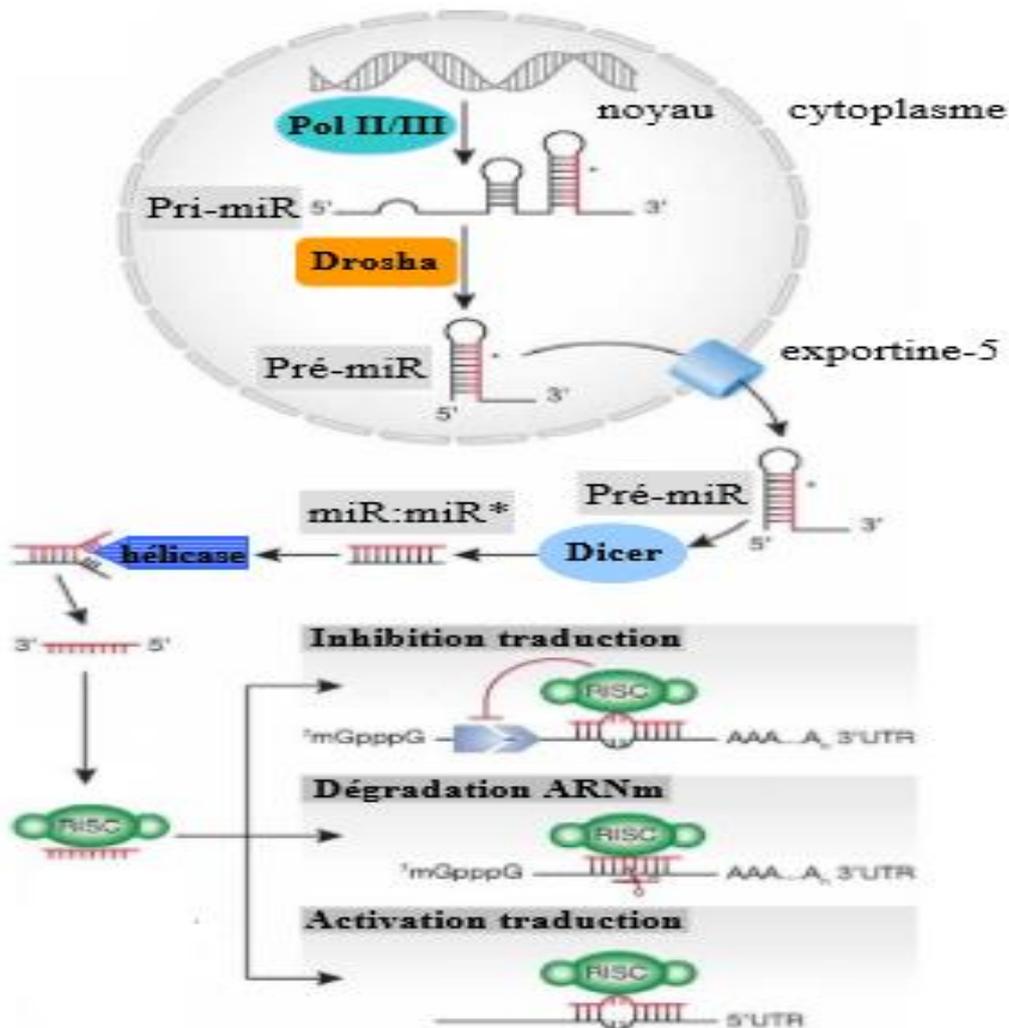


Figure 6 : Biosynthèse des miARN (Iorio et Croce, 2012).

II-3-Les miARN musculaires

Les microARN sont reconnus comme d'importants régulateurs de l'expression génique dans l'engagement de différenciation de plusieurs types cellulaires, et il a été démontré qu'ils occupent des positions hiérarchiques très élevées dans la cascade d'événements régulateurs contrôlant la spécification cellulaire. Le développement et la fonction appropriés des tissus musculaires ont également été décrits comme dépendant de l'expression contrôlée de familles spécifiques de miARN ; dans plusieurs cas, il a également été montré que leur expression ectopique peut diriger les cellules vers des programmes de différenciation spécifiques. De plus, des niveaux modifiés de miARN ont été trouvés dans plusieurs troubles musculaires tels que l'infarctus du myocarde, la dystrophie musculaire de Duchenne et d'autres myopathies.

Les myomiRs sont des miARNs exprimés exclusivement ou préférentiellement dans le muscle, squelettique et cardiaque. On désigne par myomiRs les miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208a, miR-208b, miR-486 et miR-499 (**Horak et al., 2016 ; Sempere et al., 2004 ; Small et al., 2010**). Ces miARNs possèdent des structures similaires : les miR-133a et b ne diffèrent que d'un nucléotide, le miR-1 et le miR-206 diffèrent par 4 nucléotides dans leur région 3' et ont donc la même séquence d'amorçage, et les miR-208 a et b diffèrent par trois nucléotides dans leur région 3'. Ainsi, on retrouve une redondance des gènes cibles de ces miARNs. Leurs fonctions dans le muscle sont multiples : prolifération ou différenciation des myoblastes, régénération et remodelage de la chromatine (**Horak et al., 2016 ; Cacchiarelli et al., 2010**). Les miR-1, -133a/b et -206 sont également appelés dystromiRs car leur expression est dérégulée dans les dystrophinopathies (**Vignier et al., 2013 ; Cacchiarelli et al., 2010 ; 2011 ; Hu et al., 2014**).

Les miR-1 et -206 sont des activateurs de la différenciation myogénique. Leurs gènes cibles sont communs et nombreux (**Horak et al., 2016**). Ils inhibent notamment l'expression de l'histone désacétylase 4 (HDAC4) qui est un répresseur de MEF2, un facteur de transcription du muscle squelettique (**Chen et al., 2006**). Les miR-1 et -206 activent également la différenciation musculaire des cellules satellites, les cellules souches musculaires qui permettent la régénération du muscle, en inhibant leur capacité de prolifération par la répression de Pax7 (**Chen et al., 2010, Cacchiarelli et al., 2010**). Le miR-133, à l'inverse, active la prolifération des myoblastes et donc inhibe leur différenciation en réprimant l'expression de SRF (Serum Response Factor), un facteur de transcription qui participe à

l'activation de la différenciation musculaire (Chen et al., 2006). Les pathologies musculaires peuvent entraîner une dérégulation de l'expression des miARNs et notamment des dystromiRs, permettant ainsi de discriminer certaines maladies ou différentes sévérités d'une pathologie.

II-4-Rôle des miARN dans la différenciation musculaire et la dystrophie musculaire de Duchenne

Plusieurs expériences montrent une expression différente du profil des miARNs en fonction de la maladie ou de la sévérité. Un groupe de travail a montré une dérégulation de 185 miARNs dans des biopsies musculaires de patients atteints de dix pathologies différentes parmi eux DMD (Eisenberg et al., 2007). Cette équipe a montré que 5 miARNs (miR-146b, -221, 155, -214, -222) étaient dérégulés de façon similaire dans ces dix pathologies, suggérant une voie de régulation commune à ces maladies du muscle (Sylvius et al., 2011). Une autre étude montre également qu'il existe un profil de miARNs particulier à chaque maladie, avec une diminution de l'expression du myomiR-486 dans la DMD (Eisenberg et al., 2007). Un profil particulier de miARNs dans les muscles de patients DMD ainsi que de souris mdx a également été décrit et indique une augmentation de l'expression de miARNs impliqués dans la régénération du muscle, on cite les miR-31, 34c, -206, -335, -449 et -494 (Greco et al., 2009). Ces études décrivent aussi une diminution de l'expression de miARNs impliqués dans la dégénérescence du muscle : les miR-1, 29c et 135a et une augmentation de l'expression des miARNs impliqués dans l'inflammation : les miR-222 et 223 dans les zones endommagées des muscles (Greco et al., 2009). Ces résultats sont corrélés par une autre étude qui montre une diminution de l'expression des miR-1 et -29c mais également du miR-30c et du myomiR-133 chez des souris mdx, l'expression de ces miARNs étant rétablie lorsque la Dystrophine est restaurée par saut d'exon. la diminution de l'expression des miARNs sont due à une activité accrue des HDACs au niveau des régions promotrices de ces miARNs du fait de la perte de la localisation sarcolemmale de nNOS. Après une restauration de la Dystrophine par saut d'exon, la nNOS est relocalisée au sarcolemme, les HDACs sont de nouveau nitrosylées et les miARNs sont réexprimés (Cacchiarelli et al., 2010).

De nombreuses équipes ont cherché à étudier les profils de miARNs dans le sérum, dans l'espoir de trouver des marqueurs de maladies et/ou de sévérité, qui soient non-invasifs et plus informatifs que les marqueurs actuels. Plusieurs équipes ont ainsi montré une

augmentation des miR-1, 133a/b et -206 dans les sérums de souris mdx (**Vignier et al., 2013** ; **Roberts et al., 2012**), et chez les patients atteints de DMD.

Il a également été montré que l'expression de ces trois miARNs était rétablie lorsque la Dystrophine était restaurée chez des souris mdx traitées par saut d'exon (**Roberts et al., 2012**). Par ailleurs, une autre étude montre une expression différente des miARNs chez les patients DMD circulants par rapport aux patients qui ne marchent plus (**Zaharieva et al., 2013**).

Ces résultats montrent l'importance de l'analyse des profils d'expression des miARNs dans les dystrophies musculaires, qui pourraient permettre de discriminer de façon non-invasive les différentes pathologies du muscle et d'anticiper la sévérité de la maladie et/ou le devenir d'un traitement (**Coenen-Stass et al., 2017**).

Tableau II : profils d'expression des miARN

miARN	Sérum	muscle	Modèles	Références
miR-1	↑	↓	Souris mdx et humain	(Greco et al., 2009) (Yuasa et al., 2008) (Hu et al., 2014) (Bak et Mikkelsen, 2014) (Cacchiarelli et al., 2011) (Zeng et al., 2014)
miR-29		↓	Souris mdx	(Tagnov et al., 2006)
miR-31	↑	↓	Souris mdx et humain	(Duan, 2018) (Ballarino et al., 2016)

miR-133a	↑	↓	humain	(Greco et al., 2009) (Hu et al., 2014) (Zeng et al.,2014)
miR-133b	↑	↓	humain	(Greco et al., 2009) (Yuasa et al., 2008) (Zeng et al.,2014)
miR-206	↑	↓	Souris mdx et humain	(Greco et al., 2009) (Hu et al., 2014) (Mccarthy et al.,2007) (Mizuno et al., 2011)
miR-221		↑	humain	(Antoniou et al., 2014)
miR-499	↑		humain	(Vignier et al., 2013)

Greco et., al. ont suggéré une classification des miARN impliqués dans les voies musculaires en miARN associés à :

II-4-1-Prolifération

La prolifération des myoblastes peut être induite par miR-146a, miR-1, qui cible HDAC4, et miR-133, qui réprime le facteur de réponse sérique (SRF).

II-4-2-Différentiation

Des études sur des modèles murins ont identifié miR-1 et miR-29 comme étant liés à la voie TGF- β , à la fibrose et à la différenciation myogénique. La différenciation des myoblastes et la formation de myotubes sont favorisées par miR-29 . De plus, miR-29 cible les transcrits de gènes fibrotiques (par exemple, COL3A1, FBN1, AA1, COL1A1) et est régulé à la baisse dans le muscle de mdx souris, dans une certaine mesure en raison de la régulation négative

médiée par le TGF- β . La perte de miR-29 dans les myoblastes favorise leur différenciation en myofibroblastes et augmente la fibrose.

MiR-1, exprimé dans le tissu musculaire squelettique et cardiaque adulte, favorise la différenciation musculaire ciblant HDAC4, qui à son tour inhibe l'expression des gènes du muscle squelettique. HDAC2, augmenté dans la DMD, réprime à la fois l'expression de miR-1 et miR-29 dans mdx souris; en effet, l'amélioration du sphingolipide nucléaire sphingosine-1-phosphate (S1P) inhibe l'HDAC dans le mdx muscles de souris, augmentant miR-1 et miR-29 et réduisant la fibrose.

Le miR-221 participe à la progression des myoblastes vers les myocytes et son expression provoque un retard de retrait du cycle cellulaire et l'inhibition de l'accumulation de protéines sarcomériques dans les myoblastes en différenciation. MiR-221 est régulé à la hausse en DMD, suggérant un retard dans le processus de différenciation

II-4-3-Régénération

(miR-31, miR-206, miR449), augmenté dans le modèle mdx, les patients DMD et en réponse à l'ischémie induite.

II-4-4-Inflammation

(miR-222, miR-223), exprimé en réponse à des dommages aux fibres musculaires perturbation du DAPC Les dystrophinopathies peuvent également avoir une déficience secondaire des autres composants du complexe dystrophine-glycoprotéine. De Arcangelis et "al. ont suggéré le rôle de la surexpression de miR-222 dans ce phénomène, puisqu'il se lie à la β 2-syntrophine 3'UTR dans le mdx muscle squelettique de souris avec une régulation négative conséquente de cette protéine. Pour étayer cette hypothèse, le miR-222 est régulé à la hausse dans les fibres musculaires nouvellement régénérées des chiens GRMD.

Conclusion Générale

Conclusion

L'ère de biologie moléculaire a bouleversé la génétique humaine, tant dans sa pratique quotidienne, permettant une meilleure évolution du risque de transmission des maladies héréditaires, apportant une compréhension du déterminisme de certaines maladies.

La découverte de la dystrophine, produit protéique du gène de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), est due au développement de ces technologies.

Les miARN peuvent également être utiles pour surveiller l'efficacité à travers les changements sériques ou musculaires, et se sont révélés être un domaine de recherche intéressant dans la dystrophie musculaire de Duchenne, en ce qui concerne la pathogénèse, la progression de la maladie et le traitement. Les découvertes croissantes liées aux rôles des ARN non codants dans les fonctions musculaires et leur interaction avec les miARN, sont susceptibles de fournir des informations supplémentaires pour La dystrophie musculaire de Duchenne.

Les potentiels thérapeutiques c'est le seul moyen pour guérir les patients souffrant de DMD, pour cela les recherches dans ces domaine ouvrent l'espérance pour de nombreuses familles. Le temps permettra de savoir si ces espoirs étaient motivés ou s'ils furent source de désillusions.

Références bibliographique

Références bibliographique

- Aartsma-Rus, A., Van Deutekom, J.C., Fokkema, I.F., Van Ommen, G.J., and Den Dunnen, J.T. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Hum. Mutat.* 2006 ;27: 938-945.
- Acsadi G., Dickson G., Love DR., Jani A., Walsh FS., Gurusinghe A., Wolff JA. and Davies KE. Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature* 1991 ; 352 (6338): 815-818
- Acsadi, G., et al., A differential efficiency of adenovirus-mediated in vivo gene transfer into skeletal muscle cells of different maturity. *Hum Mol Genet* 1994 ; 3(4): p. 579-84.
- Antoniou, A.; Mastroiannopoulos, N.P.; Uney, J.B.; Phylactou, L.A. MiR-186 Inhibits Muscle Cell Differentiation through Myogenin Regulation. *J. Biol. Chem* 2014 ; 289, 3923–3935.
- Bak RO, Mikkelsen JG .miRNAsponges: soaking up miR-NAs for regulation of gene expression. *WileyInterdiscipRevRNA* 2014 ;5:317–333.
- Ballarino M, Morlando M, Fatica A & Bozzoni I. Non-coding RNAs in muscle differentiation and musculoskeletal disease. *J Clin Invest* 2016 ;126, 2021–2030.
- Barton-Davis, E. R., Cordier, L., Shoturma, D. I., Leland, S. E., & Sweeney, H. L. (1999). Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *The Journal of clinical investigation* 1999 ;104(4), 375-381.
- Baumbach, L. L., Chamberlain, J. S., Ward, P. A., Farwell, N. J., & Caskey, C. T. (1989). Molecular and clinical correlations of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurology* 1989 ; 39(4), 465-465.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001 ; 409, 363–366
- Bettecken, T., and Muller, C.R. Identification of a 220-kb insertion into the Duchenne gene in a family with an atypical course of muscular dystrophy. *Genomics* 1989 ;4: 592-596.
- Bhattacharya, S., Das, A., & Bagchi, A. Domain wise distribution of mutations in dystrophin protein and duchenne muscular dystrophy. *Gene Technol* 2015 ; 4(128), 2.
- Blain, M. Développement d'un promoteur efficace et muscle spécifique pour la thérapie génique de la dystrophie musculaire de Duchenne 2008.
- Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev.* 2002 ;Apr;82(2):291-329. Review
- Blake, D. J., & Martin-Rendon, E. Intermediate filaments and the function of the dystrophin–protein complex. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2002 ; 12(5), 224-228.
- Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E., & Davies, K. E. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle 2002.
- Bodensteiner, J. B., & Engel, A. G. Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: a study of 567,000 muscle fibers in 114 biopsies. *Neurology* 1987 ; 28(5), 439-439.

Références bibliographique

- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 2004 ; 10, 185–191
- Boland, B., Himpens, B., Deneff, J. F., & Gillis, J. M. Site-dependent pathological differences in smooth muscles and skeletal muscles of the adult mdx mouse. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine* 1995 ;18(6), 649-657.
- Bowles, DE, McPhee, SW, Li, C., Gray, SJ, Samulski, JJ, Camp, AS, ... & Samulski, RJ. Thérapie génique de phase 1 pour la dystrophie musculaire de Duchenne à l'aide d'un vecteur AAV optimisé en traduction. *Thérapie moléculaire* 2012 ; 20 (2), 443-455.
- Bremmer-Bout, M., Aartsma-Rus, A., de Meijer, E.J., Kaman, W.E., Janson, A.A., Vossen, R.H., van Ommen, G.J., den Dunnen, J.T., and van Deutekom, J.C. Targeted exon skipping in transgenic DMD mice: A model for direct preclinical screening of human-specific antisense oligonucleotides. *Mol. Ther* 2004 ;10: 232-240
- Bret, C., & Schved, J. F. Le contrôle de l'expression des gènes par les microARN. Implications au cours de l'hématopoïèse et des hémopathies malignes, *Correspondances en Onco-hématologie*(2009).
- Bulfield, G., Siller, WG, Wight, PA et Moore, KJ. Dystrophie musculaire liée au chromosome X (mdx) chez la souris. *Actes de l'Académie nationale des sciences* 1984 ; 81 (4), 1189-1192.
- Bussel, B., Raphaël, J. C., & Urtizberea, J. A. Myopathies de Duchenne-Becker (Garches, [28-29 novembre 2000).
- Cacchiarelli, D., Incitti, T., Martone, J., Cesana, M., Cazzella, V., Santini, T., Sthandier, O., and Bozzoni, I. miR-31 modulates dystrophin expression: new implications for Duchenne muscular dystrophy therapy. *EMBO Rep* 2011 ; 12, 136–141.
- Cacchiarelli, D., Martone, J., Girardi, E., Cesana, M., Incitti, T., Morlando, M., Nicoletti, C., Santini, T., Sthandier, O., Barberi, L., et al. MicroRNAs Involved in Molecular Circuitries Relevant for the Duchenne Muscular Dystrophy Pathogenesis Are Controlled by the Dystrophin/nNOS Pathway. *Cell Metabolism* 2010 ; 12, 341–351.
- Cacchiarelli, D.; Legnini, I.; Martone, J.; Cazzella, V.; D'Amico, A.; Bertini, E.; Bozzoni, I. miRNAs as serum biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol. Med* 2011 ; 3, 258–265
- Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 2004 ;10, 1957–1966
- Campbell, C., & Jacob, P. Deflazacort for the treatment of Duchenne Dystrophy: a systematic review. *BMC neurology* 2003 ; 3(1), 1-10
- Carlson, C. G., Gueorguiev, A., Roshek, D. M., Ashmore, R., Chu, J. S., & Anderson, J. E. Extrajunctional resting Ca²⁺ influx is not increased in a severely dystrophic expiratory muscle (triangularis sterni) of the mdx mouse. *Neurobiology of disease* 2003 14(2), 229-239.
- Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N., and Caskey, C.T. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 1988 ;16: 11141-11156.

Références bibliographique

- Chang, N. C., Chevalier, F. P., & Rudnicki, M. A. Satellite cells in muscular dystrophy—lost in polarity. *Trends in molecular medicine* 2016 ; 22(6), 479-496.
- Chelly, J., & Kaplan, J. C. La myopathie de Duchenne, du gène DMD à la dystrophine 1988.
- Chen, J.-F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., Conlon, F.L., and Wang, D.-Z. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 2006 ;38, 228–233.
- Chen, J.-F., Tao, Y., Li, J., Deng, Z., Yan, Z., Xiao, X., and Wang, D.-Z. microRNA1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J Cell Biol* 2010 ; 190, 867–879.
- Coenen-Stass, A.M.L., Wood, M.J.A., and Roberts, T.C. Biomarker Potential of Extracellular miRNAs in Duchenne Muscular Dystrophy. *Trends in Molecular Medicine*(2017) 23, 989–1001.
- Crystal, R. G. Adenovirus: the first effective in vivo gene delivery vector. *Human gene therapy* 2014 ;25(1), 3-11
- Dalkilic, I., & Kunkel, L. M. Muscular dystrophies: genes to pathogenesis. *Current opinion in genetics & development* 2003 ; 13(3), 231-238.
- De Backer, D., Creteur, J., Preiser, J. C., Dubois, M. J., & Vincent, J. L. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002 ; 166(1), 98-104.
- Duan, Z. Y., Cai, G. Y., Li, J. J., Bu, R., Wang, N., Yin, P., & Chen, X. M. U6 can be used as a housekeeping gene for urinary sediment miRNA studies of IgA nephropathy. *Scientific reports* 2018 ; 8(1), 1-7.
- Dudley, R. W., Lu, Y., Gilbert, R., Matecki, S., Nalbantoglu, J., Petrof, B. J., & Karpati, G. Sustained improvement of muscle function one year after full-length dystrophin gene transfer into mdx mice by a gutted helper-dependent adenoviral vector. *Human gene therapy* 2004 ; 15(2), 145-156.
- Dupont-Versteegden, E. E., Katz, M. S., & McCarter, R. J. Beneficial versus adverse effects of long-term use of clenbuterol in mdx mice. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine* 1995 18(12), 1447-1459.
- Eisenberg, I., Eran, A., Nishino, I., Moggio, M., Lamperti, C., Amato, A.A., Lidov, H.G., Kang, P.B., North, K.N., Mitrani-Rosenbaum, S., et al. Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 ; 104, 17016–17021.
- Emery, A. E. Duchenne muscular dystrophy—Meryon's disease. *Neuromuscular Disorders* 1993 ; 3(4), 263-266.
- Emery, A. E. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases—a world survey. *Neuromuscular disorders* 1991 ;1(1), 19-29.
- Ervasti, J.M., Ohlendieck, K., Kahl, S.D., Gaver, M.G., and Campbell, K.P. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 1990 ; 345: 315-319.

Références bibliographique

- Forrest, S. M., Cross, G. S., Speer, A., Gardner-Medwin, D., Burn, J., & Davies, K. E. Preferential deletion of exons in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Nature* 1987 ; 329(6140), 638-640.
- Fortin, K., Nicholson, R., and Nicholson, A. Mouse ribonuclease III. cDNA structure, expression analysis, and chromosomal location. *BMC Genomics* 2002 ; 3, 26
- Fortunato, F., Rossi, R., Falzarano, M. S., & Ferlini, A. Innovative therapeutic approaches for Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Clinical Medicine* 2021 ; 10(4), 820.
- Friedman, R. C., Farh, K. K. H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 2009 ; 19(1), 92-105.
- Gilgenkrantz, S., Chery, M., Teboul, M., Mujica, P., Leotard, B., Gregoire, M. J., ... & Hanauer, A. Sublocalisation of the X breakpoint in the translocation (X; 18)(p11.2;q11.2) primary change in synovial sarcomas. *Oncogene*, 1990 ; 5(7), 1063-1066.
- Gintjee, T. J., Magh, A. S., & Bertoni, C. High throughput screening in Duchenne muscular dystrophy: from drug discovery to functional genomics. *Biology* 2014 ; 3(4), 752-780.
- Goyenville, A., Vulin, A., Fougerousse, F., Leturcq, F., Kaplan, J.C., Garcia, L., & Danos, O. Le saut d'exon thérapeutique : un espoir pour les dystrophinopathies. *M/S : médecine sciences* 2004 ; 20 (12), 1163-1165
- Gramolini AO, Jasmin BJ. Expression of the utrophin gene during myogenic differentiation. *Nucleic Acids Res.* 1999 ; Sep 1; 27(17):3603-9
- Greco, S., De Simone, M., Colussi, C., Zaccagnini, G., Fasanaro, P., Pescatori, M., Cardani, R., Perbellini, R., Isaia, E., Sale, P., et al. Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. *FASEB J.* 2009 ; 23, 3335–3346.
- Guiraud, S., Aartsma-Rus, A., Vieira, N. M., Davies, K. E., van Ommen, G. J. B., & Kunkel, L. M. The pathogenesis and therapy of muscular dystrophies. *Annual review of genomics and human genetics* 2015 ; 16, 281-308.
- Ha M & Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15, 509–524.
- Hakim, CH, Wasala, N.-B., Pan, X., Kodippili, K., Yue, Y., Zhang, K., ... & Duan, D. Un gène de micro-dystrophine à cinq répétitions a amélioré le phénotype dystrophique dans le modèle sévère DBA/2J-mdx de la dystrophie musculaire de Duchenne. *Thérapie moléculaire-Méthodes et développement clinique* ,2017 ; 6 , 216-230.
- Heslop, L., Morgan, J. E., & Partridge, T. A. Evidence for a myogenic stem cell that is exhausted in dystrophic muscle. *Journal of cell science* 2000 ; 113(12), 2299-2308.
- Horak M, Novak J & Bienertova-Vasku J .Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development. *Dev Biol* 2016 ; 410, 1–13.
- Howell, JM, Lochmüller, H., O'Hara, A., Fletcher, S., Kakulas, BA, Massie, B., ... & Karpati, G. Expression de haut niveau de la dystrophine après transfert du minigène de la dystrophine à médiation adénovirale dans le muscle squelettique de chiens dystrophiques : prolongation de l'expression avec immunosuppression. *Thérapie génique humaine* 1998 ; 9 (5), 629-634

Références bibliographique

- Hu, B., Song, J. T., Qu, H. Y., Bi, C. L., Huang, X. Z., Liu, X. X., & Zhang, M. Mechanical stretch suppresses microRNA-145 expression by activating extracellular signal-regulated kinase 1/2 and upregulating angiotensin-converting enzyme to alter vascular smooth muscle cell phenotype. *PLoS One* 2014 ; 9(5), e96338.
- Hu, X. Y., Ray, P. N., Murphy, E. G., Thompson, M. W., & Worton, R. G. Duplicational mutation at the Duchenne muscular dystrophy locus: its frequency, distribution, origin, and phenotype-genotype correlation. *American journal of human genetics* 1990 ; 46(4), 682.
- Hu, X., & Worton, R. G. Partial gene duplication as a cause of human disease. *Human mutation* 1992 ; 1(1), 3-12.
- Huard C. Transplantation de fibroblastes dermiques génétiquement modifiés dans muscle de souris dystrophique. Mémoire présenté à la Faculté des & des supérieures de l'université Laval pour L'obtention du grade maître des sciences (M. Sc.) Programme de biologie cellulaire et moléculaire. Faculté de Médecine Université Laval 1998 ; 4-14.
- Iorio, M. V. and C. M. Croce "MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review." *EMBO Mol Med* 2012 ;4(3): 143159.
- Keskas, S. Exploration moléculaire des dystrophies musculaires en Algérie (Doctoral dissertation). 2012.
- Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., and Plasterk, R.H. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 2001 ; 15, 2654–2659
- Khurana TS, Rosmarin AG, Shang J, Krag TO, Das S, Gammeltoft S. Activation of utrophin promoter by heregulin via the ets-related transcription factor complex GABinding protein alpha/beta. *Mol Biol Cell* 1999 ;Jun;10(6):2075-86.
- Kilimann, M. W., Pizzuti, A., Grompe, M., & Caskey, C. T. Point mutations and polymorphisms in the human dystrophin gene identified in genomic DNA sequences amplified by multiplex PCR. *Human genetics* 1992 ; 89(3), 253-258.
- Klein I. et Jaeger C. (Mars 2001). La dystrophie musculaire de Duchenne. AFM.
- Koenig, M., A. H. Beggs, Mea Moyer, S. Scherpf, K. Heindrich, T. Bettecken, G. Meng, C. R. Müller, M. Lindlöf, et H. Kaariainen. « The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion ». *American journal of human genetics* 45, no 4 1989: 498.
- Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C., and Kunkel, L.M. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987 ; 50, 509–517.
- Krag TO, Bogdanovich S, Jensen CJ, Fischer MD, Hansen-Schwartz J, Javazon EH, Flake AW, Edvinsson L, Khurana TS. Heregulin ameliorates the dystrophic phenotype in mdx mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 ; Sep 21;101(38):13856-60.
- Laguer, E., Cancès, C., & Ropars, J. Micro/mini-dystrophines et dystrophie musculaire de Duchenne: entre espoirs et défis. *Les Cahiers de Myologie* 2021 ; (23), 12-17.

Références bibliographique

- Landfeldt, E., Thompson, R., Sejersen, T., McMillan, H. J., Kirschner, J., & Lochmüller, H. Life expectancy at birth in Duchenne muscular dystrophy: a systematic review and meta-analysis. *European journal of epidemiology* 2020 ; 35(7), 643-653
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993 ; 75(5), 843-854.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004b ; 23, 4051–4060.
- Leturcq, F., & Kaplan, J. C. Bases moléculaires des dystrophinopathies. *Journal de la Société de Biologie* 2005 ; 199(1), 5-11.
- Liechti-Gallati, S., Braga, S., Hirsiger, H., & Moser, H. Familial deletion in Becker type muscular dystrophy within the pXJ region. *Human genetics*, 1987 ; 77(3), 267-268.
- Lim, K. R. Q., Maruyama, R., & Yokota, T. Eteplirsén in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drug design, development and therapy*, 2017 11, 533.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F. V, Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.-J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 2004 ; 305, 1437–1441
- Love DR, Forrest SM, Smith TJ, England S, Flint T, Davies KE, Speer A. Molecular analysis of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Br Med Bull.* 1989 Jul;45(3):659-80. Review
- Lu, Q.L., et al., Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle in vivo with reduced tissue damage. *Gene Ther* 2003 ; 10(5): p. 396-405.
- Lu, Q.L., Rabinowitz, A., Chen, Y.C., Yokota, T., Yin, H., Alter, J., Jadoon, A., Bou-Gharios, G., and Partridge, T. Systemic delivery of antisense oligonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005 ; 102: 198-203.
- Maiga, A. D. B. Etudes clinique, paraclinique et génétique des dystrophinopathies dans le Service de Neurologie du CHU du Point G. 2018.
- Mann, C.J., Honeyman, K., Cheng, A.J., Ly, T., Lloyd, F., Fletcher, S., Morgan, J.E., Point mutation in the human dystrophin gene: identification through Western blot analysis. *Genomics* 1991 ; 10: 457-460.
- Manno, C. S., Chew, A. J., Hutchison, S., Larson, P. J., Herzog, R. W., Arruda, V. R., ... & Glader, B. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 2003 ; 101(8), 2963-2972.
- Matsumura, K., Burghes, A. H., Mora, M., Tome, F. M., Morandi, L., Cornelli, F., Leturcq, F., Jeanpierre, M., Kaplan, J. C., Reinert, P., and . Immunohistochemical analysis of dystrophin-associated proteins in Becker/Duchenne muscular dystrophy with huge in-frame deletions in the NH2 terminal and rod domains of dystrophin. *J Clin Invest*, 93: 99-105, 1994.
- Matsuo, M., Masumura, T., Nishio, H., Nakajima, T., Kitoh, Y., Takumi, T., Koga, J., and Nakamura, H. Exon skipping during splicing of dystrophin mRNA precursor due to an intraexon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy. *Kobe J. Clin. Invest.* 1991 ; 87: 2127-2131.

Références bibliographique

McCarthy JJ, Esser KA, Andrade FH. MicroRNA-206 is overexpressed in the diaphragm but not the hindlimb muscle of mdx mouse. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 293: C451-7.

Meister G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat Rev Genet* 2013 ; 14, 447–459.

Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* 2004 ;15, 185–197.

Mendell, JR, Campbell, K., Rodino-Klapac, L., Sahenk, Z., Shilling, C., Lewis, S., ... & Walker, CM. Immunité dystrophine dans la dystrophie musculaire de Duchenne. *Journal de médecine de la Nouvelle-Angleterre.* 2010 ; 363(15), 1429-1437.

Mizuno H, Nakamura A, Aoki Y, Ito N, Kishi S, Yamamoto K, et al. Identification of muscle-specific microRNAs in serum of muscular dystrophy animal models: promising novel blood-based markers for muscular dystrophy. *PLoS One* 2011; 6: e18388

Monaco, A.P., Neve, R.L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C.J., Kurnit, D.M., and Kunkel, L.M. Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature.* 1986 ; 323, 646–650.

Monaco, AP, Bertelson CJ, Colletti-Feener C, and Kunkel LM. Localization and cloning of Xp21 deletion breakpoints involved in muscular dystrophy. *Hum. Genet* 75 :221-227, 1987

Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.* 2002 ; 16, 720–728.

Negróni, E., Riederer, I., Chaouch, S., Belicchi, M., Razini, P., Di Santo, J., ... & Mouly, V. In vivo myogenic potential of human CD133+ muscle-derived stem cells: a quantitative study. *Molecular Therapy.* 2009 ; 17(10), 1771-1778.

Nguyen, F. La dystrophie musculaire du chien Golden Retriever (GRMD) : Etude histologique de la forme néonatale fulminante et contribution à l'étude de la pathogénie des lésions. Thèse Méd. Vét. Nantes. 2001.

Nguyen-Tran, D. H., Hait, N. C., Sperber, H., Qi, J., Fischer, K., Ieronimakis, N., ... & Ruohola-Baker, H. Molecular mechanism of sphingosine-1-phosphate action in Duchenne muscular dystrophy. *Disease Models & Mechanisms.* 2014 ; 7(1), 41-54.

Odom, GL, Gregorevic, P., Allen, JM, Finn, E. et Chamberlain, JS. L'administration de microtrophine par rAAV6 augmente la durée de vie et améliore la fonction musculaire chez les souris dystrophiques déficientes en dystrophine/utrophine. *Thérapie moléculaire.* 2008 ; 16 (9), 1539-154

Ohlendieck, K., Matsumura, K., Ionasescu, V.V., Towbin, J.A., Bosch, E.P., Weinstein, S.L., Sernett, S.W., and Campbell, K.P. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin-associated proteins in the sarcolemma. *Neurology.* 1993 ; 43: 795-800.

Oshima, J., Magner, D. B., Lee, J. A., Breman, A. M., Schmitt, E. S., White, L. D., ... & Del Gaudio, D. Regional genomic instability predisposes to complex dystrophin gene rearrangements. *Human Genetics.* 2009 ; 126(3), 411-423.

Références bibliographique

- Partridge, T. A. Invited review: myoblast transfer: a possible therapy for inherited myopathies?. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*, 1991 14(3), 197-212.
- Partridge, T.A., and Wilton, S.D. (2001) Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the mdx mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001 ;98: 42-47.
- Pestronk, A., Parhad, I. M., Drachman, D. B., & Price, D. L. Membrane myopathy: morphological similarities to Duchenne muscular dystrophy. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*, 1982 5(3), 209-214.
- Petiot, P., and Urtizberea, J.A. Diagnostic des maladies musculaires. *Encyclopédie médico-chirurgicale* 2004 17-007-A-30.
- Pizzuti, A., Pieretti, M., Fenwick, R.G., Gibbs, R.A., and Caskey, C.T. A transposon-like element in the deletion-prone region of the dystrophin gene. *Genomics* 1992 ;13: 594-600.
- Prelle, A., Moggio, M., Checcarelli, N., Comi, G., Bresolin, N., Battistel, A., ... & Scarlato, G. Multiple deletions of mitochondrial DNA in a patient with periodic attacks of paralysis. *Journal of the neurological sciences*, 1993 ; 117(1-2), 24-27.
- Price, F. D., Kuroda, K., & Rudnicki, M. A. Stem cell based therapies to treat muscular dystrophy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2007 ; 1772(2), 272-283.
- Prior, T.W., and Bridgeman, S.J. Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy. *J. Mol. Diagn.* 2005 ;7: 317-326.
- Read, A. P., Mountford, R. C., Forrest, S. M., Kenwick, S. J., Davies, K. E., & Harris, R. Patterns of exon deletions in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Human genetics*, 1988 80(2), 152-156.
- Ricotti, V., Spinty, S., Roper, H., Hughes, I., Tejura, B., Robinson, N., ... & Tinsley, J. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of SMT C1100, a 2-Arylbenzoxazole utrophin modulator, following single- and multiple-dose administration to pediatric patients with Duchenne muscular dystrophy. *PloS one*, 2016 ; 11(4), e0152840.
- Roberts, R. G., Gardner, R. J., & Bobrow, M. Searching for the 1 in 2,400,000: a review of dystrophin gene point mutations. *Human mutation*, 1994 4(1), 1-11.
- Roberts, R.G., Bobrow, M., and Bentley, D.R. Point mutations in the dystrophin gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1992 ;89: 2331-2335.
- Roberts, T.C., Blomberg, K.E.M., McClorey, G., Andaloussi, S.E., Godfrey, C., Betts, C., Coursindel, T., Gait, M.J., Edvard Smith, C., and Wood, M.J. Expression Analysis in Multiple Muscle Groups and Serum Reveals Complexity in the MicroRNA Transcriptome of the mdx Mouse with Implications for Therapy. *Mol Ther Nucleic Acids* 2012 ; 1, e39.

Références bibliographique

- Rybakova, I. N., Patel, J. R., & Ervasti, J. M. The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *The Journal of cell biology* 2000 ;150(5), 1209-1214.
- Salima, Benseghir. Diagnostic moléculaire des dystrophinopathies (étude phénotypique et génotypique) 2017.
- Sempere, L.F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., and Ambros, V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* 2004 ; 5, R13.
- Serratrice G., Pellissier J., Pouget J. Les maladies neuromusculaires. Paris : Masson, 1997, p.17-20.
- Serratrice, G., Kozak-Ribbens, G., & Cozzone, P. J. Aspects neurologiques de l'hyperthermie maligne clinique, physiopathologie, génétique. *Revue neurologique (Paris)* 1997 ; 153(5), 304-313.
- Sharma M, Juvvuna PK, Kukreti H &McFarlane C.Megaroles of microRNAs in regulation of skeletal musclehealth and disease. *Front Physiol* 2014 5, 239.
- Small, E.M., O'Rourke, J.R., Moresi, V., Sutherland, L.B., McAnally, J., Gerard, R.D., Richardson, J.A., and Olson, E.N. Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscleenriched microRNA-486. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 ;107, 4218–4223.
- Snow, M. H. An autoradiographic study of satellite cell differentiation into regenerating myotubes following transplantation of muscles in young rats. *Cell and tissue research*, 1987 ;186(3), 535-540.
- Stephan, L. Amélioration de la transplantation de myoblastes un traitement possible de la dystrophie musculaire de Duchenne: utilisation de la forme active de la vitamine D3 et obtention d'une tolérance immunologique par l'administration de drogues cytoréductrices.2008.
- Straub, V., & Campbell, K. P Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Current opinion in neurology*,1997 10, 168-175.
- Sylvius, N., Bonne, G. L., Straatman, K., Reddy, T., Gant, T. W., & Shackleton, S. MicroRNA expression profiling in patients withlamin A/C-associatedmusculardystrophy. *The FASEB Journal*,2011 25(11), 3966-3978.
- Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA*2006 ; 103:12481–12486.
- Tinsley, J., Deconinck, N., Fisher, R., Kahn, D., Phelps, S., Gillis, J. M., & Davies, K. Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nature medicine*, 1988 ;4(12), 1441-1444.

Références bibliographique

- Torrente, Y., Belicchi, M., Marchesi, C., D'antona, G., Cogiamanian, F., Pisati, F., ... & Bresolin, N. Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients. *Cell transplantation*, 2007 ;216(6), 563-577.
- Torrente, Y., Belicchi, M., Sampaolesi, M., Pisati, F., Meregalli, M., D'Antona, G., ... & Bresolin, N. Humancirculating AC133+ stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophicskeletal muscle. *The Journal of clinical investigation*, 2004 ;114(2), 182-195.
- Vignier, N., Amor, F., Fogel, P., Duvallet, A., Poupiot, J., Charrier, S., Arock, M., Montus, M., Nelson, I., Richard, I., et al. Distinctive Serum miRNA Profile in Mouse Models of Striated Muscular Pathologies. *PLOS ONE* 2013 ; 8, e55281.
- Vilquin, JT, Kennel, PF, Patureau-Jouas, M., Chapdelaine, P., Boissel, N., Delaere, P., ... & Schwartz, K. Electrotransfert d'ADN nu dans les muscles squelettiques de modèles animaux de dystrophies musculaires. *Thérapie génique* 2001 ; 8 (14), 1097-1107.
- Vinod, M., Rodino-Klapac, L.R., Viollet, L., and Mendell, J.R. Aminoglycoside-induced mutation suppression (stop codon readthrough) as a therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Ther. Adv. Neurol. Disord* 2010 ;3: 379-389.
- Wang, Z., Allen, JM, Riddell, SR, Gregorevic, P., Storb, R., Tapscott, SJ, ... & Kuhr, CS .Immunité au transfert de gènes à médiation virale adéno-associée dans un modèle canin de la dystrophie musculaire de Duchenne de race aléatoire. *Thérapie génique humaine* 2007 ; 18(1), 18-26
- White, S.J., Aartsma-Rus, A., Flanigan, K.M., Weiss, R.B., Kneppers, A.L.J., Lalic, T., Janson, A.A.M., Ginjaar, H.B., Breuning, M.H., and den Dunnen, J.T. Duplications in the DMD gene. *Hum. Mutat* 2006 ;27: 938-945.
- Williams AH, Valdez G, Moresi V, Qi X, McAnally J, et al. MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. *Science* 2009 ;326: 1549–1554.
- Yuasa K, Hagiwara Y, Ando M, Nakamura A, Takeda S, Hijikata T. MicroRNA-206 is highly expressed in newly formed muscle fibers: implications regarding potential for muscle regeneration and maturation in muscular dystrophy. *Cell Struct Funct.* 2008; 33: 163-9.
- Zaharieva, I.T., Calissano, M., Scoto, M., Preston, M., Cirak, S., Feng, L., Collins, J., Kole, R., Guglieri, M., Straub, V., et al. Dystromirs as Serum Biomarkers for Monitoring the Disease Severity in Duchenne Muscular Dystrophy 2013 ; *PLOS ONE* 8, e80263.
- Zaiss, A.K., H.B. Machado, and H.R. Herschman, The influence of innate and preexisting immunity on adenovirus therapy. *J Cell Biochem*, 2009. 108(4): p. 778-90.

Références bibliographique

Zanotti, S., Gibertini, S., Blasevich, F., Bragato, C., Ruggieri, A., Saredi, S., ... & Mora, M. Exosomes and exosomal miRNAs from muscle-derived fibroblasts promote skeletal muscle fibrosis. *Matrix Biology* 2018 ; 74, 77-100.

Zeman, R. J., Peng, H., Danon, M.J., and Etlinger, J.D. Clenbuterol reduces degeneration of exercised or aged dystrophic (mdx) muscle. *Muscle Nerve* 2000 ;23: 521-528.

Zeman, R.J., Zhang, Y., and Etlinger, J.D. Clenbuterol, a beta 2-agonist, retards wasting and loss of contractility in irradiated dystrophic mdx muscle. *Am. J. Physiol* 1994 ;267:C865-868.

Zeng L, Cui J, Wu H, et al. The emerging role of circulating microRNAs as biomarkers in autoimmune diseases. *Autoimmunity* 2014; 47:419–429.

Résumé

La dystrophie musculaire de Duchenne est une maladie génétique récessive liée au chromosome X, causée par des mutations dans le gène de la dystrophine. Les symptômes caractéristiques de cette maladie comprennent la dégénérescence progressive des muscles squelettiques, la cardiomyopathie et le dysfonctionnement respiratoire. Plusieurs approches thérapeutiques sont en cours de développement pour limiter les conséquences de l'absence de dystrophine ou pour apporter au muscle la dystrophine manquante. Les miARN sont promoteur à la fois en tant que biomarqueur pour améliorer le diagnostic et le suivi de la progression et du traitement de la DMD, et en tant que cibles thérapeutiques qui peuvent être régulées à la hausse ou à la baisse pour améliorer les symptômes de stade précoce et tardif de la DMD.

Mots clés : gène DMD, dystrophie musculaire Duchenne, biomarqueur, protéine dystrophine

Abstracte

Duchene muscular dystrophy is an X-linked recessive genetic disease caused by mutations in the dystrophin gene. Characteristic symptoms of this disease include progressive skeletal muscle degeneration, cardiomyopathy, and respiratory dysfunction. Several therapeutic approaches are under development to limit the consequences of the absence of dystrophin or to provide muscles with the missing dystrophin. MiRNAs are promoters both as a biomarker to improve the diagnosis and the monitoring of progression and disease. treatment of DMD, and as therapeutic targets that can be up-regulated or down-regulated to improve early and late stage symptoms of DMD.