

## Résumé

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie neuromusculaire progressive qui touche 1 garçon sur 3500. Elle est liée au chromosome X et caractérisée par l'absence de dystrophine, une protéine du sous-sarcolemme qui confère de la stabilité à la membrane cellulaire en connectant l'actine du cytosquelette avec la matrice extracellulaire. Elle fait partie d'un complexe multi protéiques nommé «Dystrophin Associated Protein Complex (DAPC)», qui contient, parmi d'autres composants, le  $\beta$ -dystroglycane et la nitric oxide synthase (NOS) (1) (**Figure 1**).

Le gène de la dystrophine est un des plus grands du génome humain (2.5Mb), il est composé de 79 exons. Il comporte 3 promoteurs qui codent pour la forme entière de la protéine et quatre autres pour des formes tronquées de celle-ci (2) (**Figure 2**).

L'absence de la dystrophine provoque la dérégulation de l'homéostasie calcique, la nécrose tissulaire, l'accumulation progressive de tissu graisseux et fibreux, l'incapacité de mouvement qui abouti vers l'âge de 10 ans au fauteuil roulant. Ensuite s'installe progressivement une cardiomyopathie, une insuffisance respiratoire, et une déformation de la colonne vertébrale (3) (**Figure 3**) qui accentuent le défaut respiratoire et entraînent le décès des patients, l'espérance de vie de ces patients est de 20-30 ans.

Il n'existe pas de traitements curatifs pour cette maladie mais seulement des traitements qui vont agir sur les conséquences de l'absence de la dystrophine et les produits les plus utilisés sont les corticostéroïdes (pour leurs effets anti-inflammatoires) et les inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine (ACE) pour la cardiomyopathie. La recherche d'un traitement efficace contre la DMD peut être divisé en trois catégories : des stratégies qui vont améliorer les conséquences de l'absence de dystrophine, des stratégies qui vont ré-exprimer la dystrophine et des stratégies qui ont comme cible l'utrophine. L'utrophine est fondamentale pour le développement correct du muscle pendant la vie prénatale, mais vers la 40<sup>ème</sup> semaine de gestation, le gène est réprimé sous l'effet des histones déacetylase et, la dystrophine est exprimée à sa place. Pendant la vie adulte la protéine utrophine reste confinée à des endroits restreints, par exemple au niveau des jonctions neuromusculaires (**Figure 4**).

## Objectifs

L'objectif de mon travail de Thèse a été de tester de nouvelles molécules pour améliorer le phénotype dystrophique en particulier en agissant *via* l'activation de deux voies indépendantes : la voie de l'oxyde nitrique (NO) et celle de l'inhibition des histones déacetylase, grâce à la présence de L-arginine (substrats de la NOS) et du butyrate dans la composition des produits à tester.

Pour cela j'ai testé *in vivo*, chez la souris *mdx*, le modèle animal le plus utilisé pour étudier la DMD et *in vitro*, dans des cultures de cellules humaines, trois produits : le butyrate d'arginine (AB), le 3-hydroxybutyrate d'arginine (ABE) et l'N-butyrilarginine (ABA) (**Figure 5**). Les deux derniers ont été synthétisés à partir du AB en remplaçant la liaison saline (ionique) par des liens covalents entre le butyrate et l'arginine. L'idée d'utiliser le AB dérive de l'homologie entre cette maladie et les hémoglobinopathies ou la forme adulte de l'hémoglobine est absente. Le AB est actuellement utilisé en clinique pour traiter les patients qui souffrent d'hémoglobinopathie car il est capable de réactiver l'expression de la forme fœtal de l'hémoglobine. Dans notre cas le gène ciblé est celui de l'utrophine, la forme fœtal de la dystrophine. Un des objectifs du travail a été de vérifier si le traitement avec les trois produits est capable d'induire une augmentation du niveau d'utrophine.

En particulier, les objectifs des travaux sur la souris *mdx* ont été de:

- Comparer les effets du AB administré soit par voie intrapéritonéale (i.p.) soit par voie orale, cette dernière n'ayant jamais été testée,
- Comparer les effets des deux produits de synthèse avec les effets du AB,
- Déterminer la dose optimale du ABE et/ou ABA à utiliser sur les souris *mdx* et vérifier si elle est inférieure à celle du AB.

Pour répondre à ces questions les paramètres suivants ont été évalués :

- 1) Le **poids** des souris traitées: la perte de poids est un signe de toxicité d'un produit, alors que la stabilité ou la prise de poids sont des signes de bonne tolérance de l'organisme au produit.
- 2) **Amélioration fonctionnelle** (force et résistance à la fatigue): un produit qui a été conçu pour être utilisé en clinique doit entraîner une amélioration fonctionnelle.
- 3) La perméabilité membranaire a été évaluée grâce à la mesure du taux sérique de **créatine kinase** (CK) : la diminution de CK dans le sérum est un signe de stabilité et/ou de restauration de la membrane cellulaire.

4) Le niveau d'**utrophine** dans le cœur et dans le muscle *gastrocnemius* a été évalué chez les souris traitées.

5) En collaboration, j'ai vérifié si les drogues sont capables de reverser ou d'améliorer les différences en terme d'**excitabilité neuromusculaire** entre souris C57BL/10 et *mdx*. L'excitabilité neuromusculaire a été étudiée avec un nouveau software, QTRAC, développé par Pr. Bostock (Institute of Neurology, London) pour une analyse non-invasive des propriétés d'excitabilité *in vivo* chez des patients et ensuite adapté pour les animaux. Avec cette technique plus de 40 paramètres vont sortir pour l'analyse. La même technique a été utilisée pour étudier l'évolution en fonction de l'âge des paramètres d'excitabilité neuromusculaire et par rapport aux souris C57BL/10.

6) Au cours de mes travaux, j'ai particulièrement travaillé sur le cœur, en collaboration avec Y Fromes et S. Bouyon (Thérapie des maladies du muscle strié / Institut de Myologie/Plateau de physiologie expérimentale et évaluation *in vivo* des biothérapies. UMRS 974 - UPMC Univ. Paris 6 / U974 - Inserm / UMR7215 - CNRS/AIM, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris), et Allain Brunelle (Laboratoire de Spectrométrie de Masse, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Gif sur Yvette). Il est important d'étudier le muscle cardiaque dans le cadre de la dystrophie musculaire de Duchenne car les patients DMD décèdent principalement en raison d'un déficit cardiaque. Le cœur a aussi été utilisé comme modèle d'organe incapable de régénérer, pour étudier la composition lipidique de la membrane des cardiomyocytes des souris traitées, car il a été montré le rétablissement d'un profil lipidique normal, dans le muscle squelettique, après ce type de traitement. En plus, pour quatre groupes des souris (C57BL/10, *mdx* non traitées, *mdx* traitées par du AB ou du ABE) l'évolution de la cardiomyopathie a été suivie par électrocardiographie à partir de l'âge de 8 mois jusqu'à l'âge de 15 mois. A la fin du suivi des analyses histologiques ont été faites.

7) En collaboration avec M. Herbin et Thierry Deschamps (Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS - UMR7179, Pavillon d'anatomie comparée, Paris) et C. Sébrié (CNRS, IR4M – UMR8081, Orsay) l'**index de cyphose** a été calculé par deux méthodes (la vidéoradiographie et l'imagerie par RMN) car l'altération de la colonne vertébrale est un des signes particuliers des patients DMD. La cyphose/lordose renforce le dysfonctionnement respiratoire chez les garçons affectés, a aussi un impact négatif sur leur qualité de la vie, elle nécessite d'avoir recours à la chirurgie et est source de douleurs chroniques. L'effet d'un traitement chronique avec du AB et de ABE a été évalué.

D'autre part les objectifs des travaux *in vitro* ont été de:

- Vérifier l'effet des 3 drogues sur le niveau des trois protéines d'intérêt dans le cas des dystrophies : l'utrophine, le  $\beta$ -dystroglycane et la myosine embryonnaire, dans des myotubes primaires et de lignes cellulaires dystrophiques humaines.
- Comparer les effets des deux nouvelles drogues de synthèse (ABE et ABA) avec les effets de la formulation saline (AB).
- Enfin, en collaboration avec José Cancela (Centre de Neurosciences Paris-Sud, Orsay) j'ai étudié l'activité calcique spontanée dans des myotubes humains sains et dystrophiques. Les cellules dystrophiques ont été étudiées après 48 h de traitement avec du ABE, ABA, B (butyrate), A (arginine) ou de la TSA (trichostatine A).

## Résultats

### In Vivo

Dans un premier temps j'ai comparé deux voies d'administration (i.p. et gavage) du AB, car il a été montré qu'il est capable d'activer l'expression de l'utrophine quand il est administré par i.p., mais, la pose d'un cathéter permanent est une source d'infection en particulier pour des enfants, il est donc important de trouver une voie d'administration bien tolérée comme la voie orale. Les résultats que nous avons obtenus (structurels et fonctionnels : réduction du pourcentage de surface nécrosée dans le cœur, amélioration des mesures de force et résistance à la fatigue du muscle, réversion des anomalies de l'excitabilité neuromusculaire) montrent que les deux voies d'administration donnent des résultats comparables.

Le choix de faire synthétiser deux produits qui possèdent des liens covalents dérive du fait que la dose efficace de AB est élevée (800 mg/kg/j), car le AB est un sel, il est donc rapidement dissocié. Avec l'utilisation de l'ABE et du ABA on peut imaginer que ces deux produits passent la barrière gastro-intestinale presque intacts et que l'on pourra donc administrer des doses inférieures à celle du AB. La gamme des concentrations des deux produits de synthèse avec laquelle les souris ont été traitées est : 50, 80, 100, 200, 400 et 800 mg/kg/j. Le protocole d'administration pour cette première partie de ma thèse est appelé protocole à cours terme car les souris entrent dans le protocole à l'âge de 6 semaines et en sortent à 14 semaines. Elles sont traitées 4 jours par semaine, une semaine sur deux.

Nous avons obtenu des résultats positifs avec les deux produits à des concentrations 10 fois inférieures au AB. En particulier les souris traitées avec du ABE à la concentration 80 mg/kg/j

montrent une augmentation de la force développée par rapport aux *mdx* gavées avec de la solution saline, une diminution de 85% du taux sérique de CK et l'incorporation du Blue Evans dans 3% des fibres des muscles de la patte, *versus* 11% chez les souris saline. Le ABE protège le cœur de la dégénérescence tissulaire, (une diminution de 74% de la surface de tissu nécrotique est visible), le retour à un profil lipidique normal au niveau de la membrane du muscle cardiaque, et surtout un effet dose-réponse très net sur les paramètres d'excitabilité neuromusculaire, entre les animaux *sains* (C57BL/10) et *mdx*, après traitement par ABE et ABA à des doses faibles (50-100 mg/kg/j).

A partir de ces résultats, le choix du gavage comme voie d'administration et les effets positifs en particulier avec le ABE à 80 mg/kg/d, dans un deuxième temps de ma thèse, je me suis focalisée sur le cœur et la cyphose. Pour cette partie les souris ont été traitées avec un protocole à long terme, au lieu d'arrêter le traitement à 14 semaine, les souris ont été gavées jusqu'à l'âge de 14 mois avec du AB à 800 mg/kg/d ou du ABE à 80 mg/kg/d. A partir de l'âge de 8-9 mois, âge auquel le déficit cardiaque chez la souris apparaît, un suivi mensuel par échocardiographie a été réalisé pour suivre l'évolution de la cardiomyopathie et l'effet des traitements. Les souris traitées avec du AB montrent une amélioration fonctionnelle du cœur en terme de fraction d'éjection et de fraction de raccourcissement: les souris saline présentent une diminution progressive de ces deux paramètres avec l'âge, au contraire, pour les souris traitées avec du AB, ces deux paramètres restent stables pendant l'étude, comme chez les souris C57/BL10. Cependant les souris traitées avec ABE ne présentent pas un effet de maintien de la fonction cardiaque. En plus, deux caractéristiques de la cardiomyopathie, la dilatation du ventricule gauche et l'hypertrophie, bien visibles chez les souris *mdx* non traitées, n'apparaissent pas avec le traitement AB, mais apparaissent avec le traitement ABE. En fin, l'index de cyphoses qui a été diminué de 24% pour les souris *mdx* salines par rapport aux C57BL/10, est presque complètement reversé chez les souris traitées avec le AB mais pas chez les souris traitées avec l'ABE. Ces résultats sont particulièrement encourageants dans la perspective d'une utilisation du AB en clinique pour traiter les patients DMD.

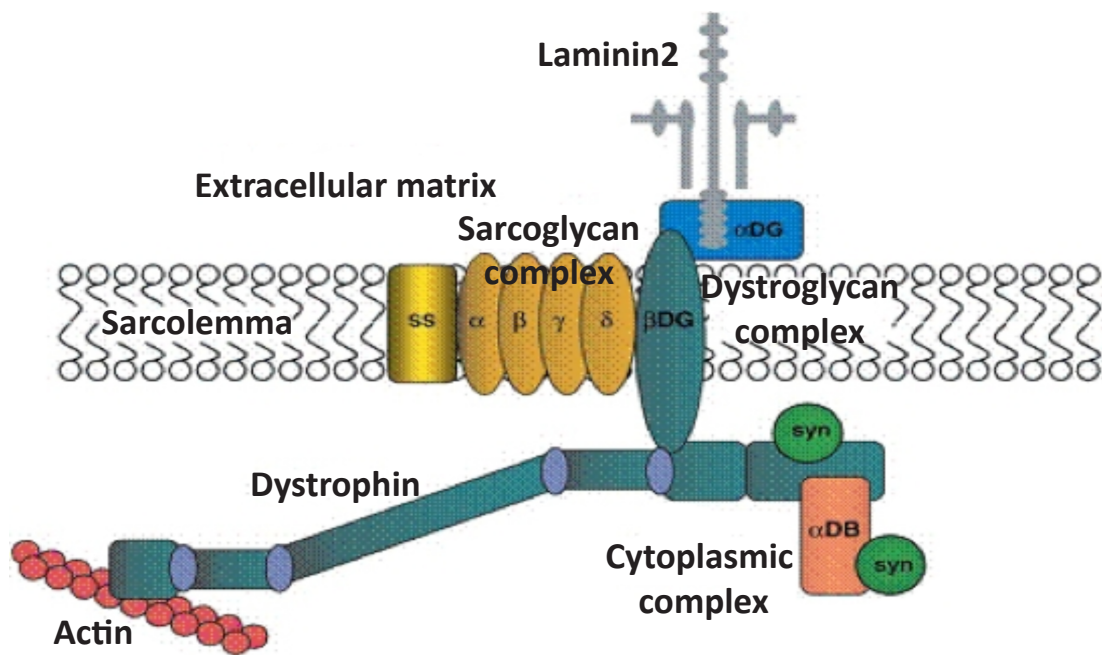
## **In Vitro**

Les trois produits, AB, ABE et ABA ont été testés *in vitro* sur des myotubes humains, pour tester leur capacité à induire l'augmentation d'utrophine après 48h de traitement. La gamme de

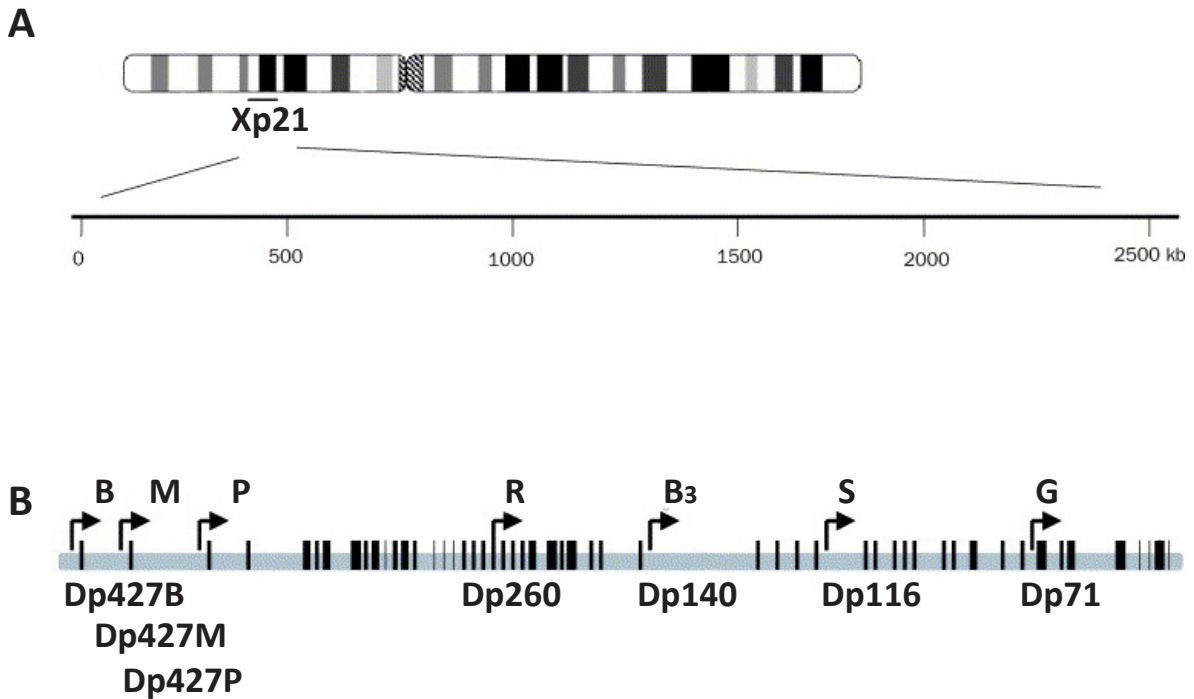
concentration utilisé a été : 0.002, 0.005, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 and 2 mM. Le traitement avec les trois produits induit une augmentation des niveaux d'utrophine, de  $\beta$ -dystroglycane et de myosine embryonnaire de 1.5-2.5 fois, comparée aux cultures non traitées. En parallèle, pour examiner la contribution de butyrate sur l'augmentation du niveau de l'utrophine, nous avons testé quatre inhibiteurs d' HDAC: la trichostatine, l'acide valproïque, l'isobutyramide et le butyrate, et nous avons démontré que tous augmentent le niveau d'utrophine et des protéines liées,  $\beta$ -dystroglycane et myosine embryonnaire, d'environ 2-3 fois. Enfin, je me suis intéressée à la possibilité que chacun de ces traitements (AB, ABE, ABA , mais aussi la L-arginine, le butyrate et la trichostatine), du fait qu'ils restaurent l'intégrité sarcolemmale, influence l'homéostasie calcique. Les myotubes humains en culture ont été traités pour 48h avec les produits cités, puis chargés avec une sonde qui lie le calcium et les oscillations calciques ont été enregistrées pendant 10 minutes. 64% des cellules non traitées présentent une activité calcique spontanée d'amplitude 2 fois super à l'activité de repos et une fréquence de 2 pics par minute, alors que les myotubes de donneurs sains ne présentent aucune activité. Une nette diminution (50%) de l'activité spontanée a été enregistrée dans le cas des cultures traitées avec les différents produits.

Tous les résultats obtenus au cours de mon travail de thèse confortent la possibilité que le AB puisse être rapidement testé dans une étude pilote sur des patients DMD, et que ABE et ABA puissent être développés, pour des essais cliniques futurs sur des patients DMD, et potentiellement sur des patients atteints d'hémoglobinopathies.

1. Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev.* 2002;82(2):291–329.
2. Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* 2003;2(12):731–740.
3. Oda T et al. Longitudinal study of spinal deformity in Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr Orthop.* 1993;13(4):478–488.

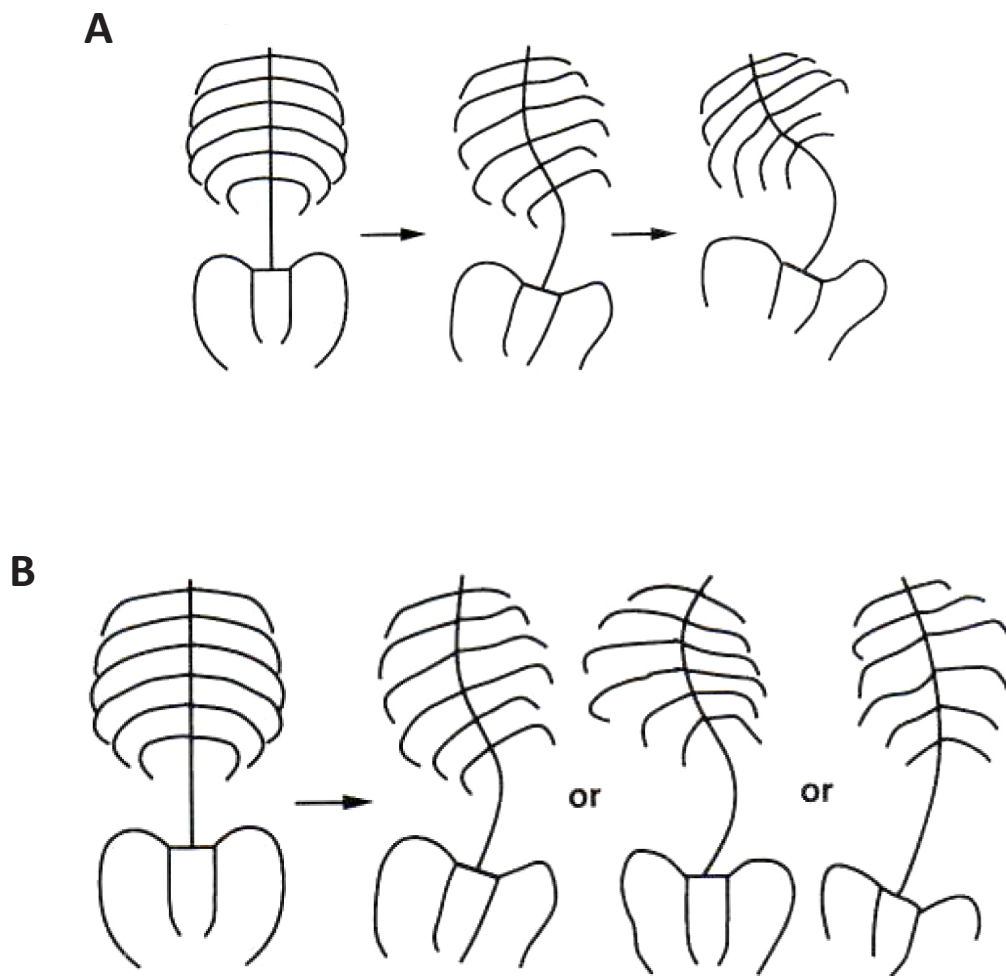


**Figure 1:** . Le “dystrophin-associated protein complex” (DPC) dans les muscles squelettiques. La dystrophine va se lier à l’actine du cytosquelette par son coté NH2. Par le coté COOH terminal elle est associée avec le complexe des dystroglycanes, des sarcoglycanes-sarcospanes et avec d’autres complexes cytoplasmiques. Adapté de (Blake et al. 2002).

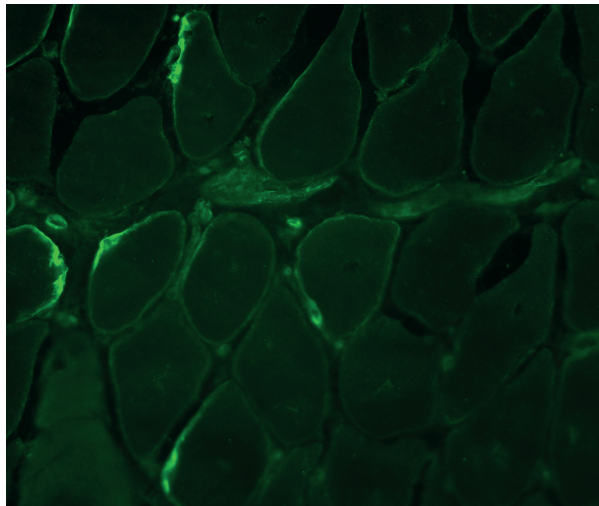


**Figure 2:** (A) Représentation schématique du chromosome X. Le gène de la dystrophine est situé en Xp21.2, sa taille est de 2.5 Mb et il est composé de 79 exons. (B) 3 différents promoteurs qui codent pour la forme entière de la protéine et quatre autres pour des formes tronquées de celle-ci sont présents dans le gène qui codent pour la forme entière de la protéine (Dp 427) dans différents tissus: B pour le cerveau, M pour les muscles et P pour Purkinje. Il y a aussi 3 autres promoteurs qui codent pour des formes tronquées de celle-ci qui sont localisées dans la rétine (Dp260), le cerveau (Dp140), les nerfs périphériques (Dp116) et une forme ubiquitaire (Dp71). Adapté de (Muntoni et al. 2003).



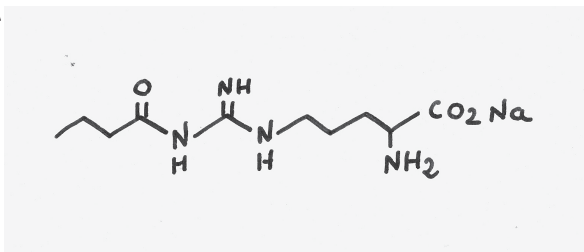


**Figure 3:** Représentation schématique de la colonne vertébrale des patients DMD. (A) Exemple de progression vers la cyphose et (B) transition de cyphose à la lordose. Adapté de (Oda et al. 1993).

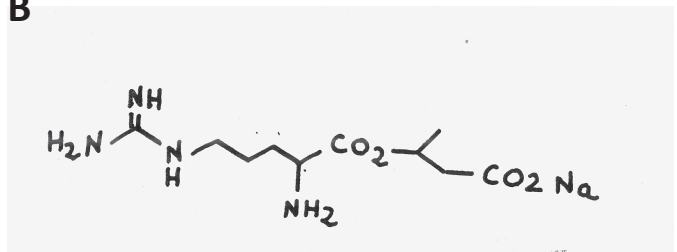


**Figure 4:** Schéma de l'organisation moléculaire de la jonction neuromusculaire.

**A**



**B**



**Figure 5:** Schéma de la structure du (A) ABA (N-butylarginine) et du (B) ABE (3-hydroxybutyrate d'arginine).

## Publications et manuscrits :

- “ Arginine butyrate: A Therapeutic Candidate for Duchenne Muscular Dystrophy “ S. Vianello, H. Yu, V Voisin, H. Haddad, X. He, A. S. Foutz, C. Sebr  , B Gillet, M Roulot, F. Fougerousse, C Perronnet, C Vaillend, S Matecki, D Escolar, L Bossi, M Isra  l, S de la Porte. The FASEB Journal article fj.12-215723. Published online February 21, 2013.
- “Compatibility between TOF-SIMS lipid imaging and histological staining on a rat brain section” C. Bich, S. Vianello, V. Gu  rineau, D. Touboul, S. De La Porte and A. Brunelle. *Surface Interface Analysis*, proceedings of the conference SISM XVIII)
- “Per os administration of arginine butyrate preserve *mdx* mice from cardiomyopathy, kyphosis and axonal excitability defaults”. S. Vianello, S. Bouyon, E. Benoit, D. Boerio, M. Herbin, M. Roulot, Y. Fromes and S. De La Porte’ manuscript in preparation.
- “Arginine butyrate derivatives are highly efficient to alleviate dystrophic phenotype in *mdx* mice treated *per os* and in human myotubes” S. Vianello, C. Bich, E. Benoit, M. Roulot, A. Brunelle, S. De La Porte, manuscript in preparation.
- “Longitudinal study of some dystrophic phenotypes (neuromuscular excitability, skeletal muscle force and fatigue, serum creatine kinase level) in maturing *mdx* mice compared with wild-type animals” S. Vianello D. B  erio, S. de la Porte and E. Benoit, manuscript in preparation.