



HAL
open science

Identification d'ARNs non-codants impliqués dans les dystrophinopathies

Marine Guilbaud

► **To cite this version:**

Marine Guilbaud. Identification d'ARNs non-codants impliqués dans les dystrophinopathies. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS042 . tel-02121057

HAL Id: tel-02121057

<https://theses.hal.science/tel-02121057>

Submitted on 6 May 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Sorbonne Université

Ecole doctorale Complexité du Vivant

Centre de Recherche en Myologie – U974

Thérapeutiques basées sur la réparation de l'ARN et physiopathologie du muscle squelettique

Thèse de doctorat de Biologie

**Identification d'ARNs non-codants impliqués
dans les dystrophinopathies**

Présentée par Marine GUILBAUD

Dirigée par Dr. France PIETRI-ROUXEL

Présentée et soutenue publiquement le 30 janvier 2018

Devant les membres du jury :

Président :	Pr. Onnik AGBULUT
Rapporteurs :	Dr. Isabelle RICHARD Pr. Patrice ROLL
Examineurs :	Pr. Helge AMTHOR Dr. David ISRAELI
Directrice de thèse :	Dr. France PIETRI-ROUXEL

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier les membres de mon jury : mes rapporteurs, Dr. Isabelle Richard et Pr. Patrice Roll, qui avez eu la gentillesse d'accepter de lire et évaluer mon travail. Pr. Helge Amthor et Pr Onnik Agbulut pour avoir bien voulu prendre de votre temps pour évaluer cette thèse et Dr. David Israël, qui en plus d'être examinateur de ma thèse a également accepté de faire partie de mon comité, vous avez donc suivi les péripéties de ce travail et je vous en remercie.

Je voudrais ensuite remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin m'ont permis de terminer cette thèse.

France Piétri-Rouxel, tout d'abord, qui m'a confié ce projet qu'elle a construit. Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée. J'ai souvent douté mais je suis fière que cette thèse ait abouti. Je te remercie d'avoir été derrière moi tout au long de ces trois années qui m'ont permis de grandir, scientifiquement, professionnellement et personnellement.

Je remercie également Nicolas Vignier, Frédéric Auradé, Laurence Jeanson-Leh, Rabah Ben Yaou, France Leturq et les membres du CNG qui ont tous permis que ce projet existe, par leurs conseils scientifiques, leur aide technique et leur expertise.

Un grand merci à Christel Gentil, Carole Gruszczynski, Sestina Falcone et Cécile Peccate qui m'ont formée techniquement. Vous avez eu la patience de m'expliquer les bases de la pratique des techniques de laboratoire quand j'étais en master et après, je vous en remercie. Cécile, la MacGyver de l'équipe ou le couteau-suisse, en bref celle vers qui on se tourne quand on ne sait pas. Carole, ma maman du labo, qui me faisait déculpabiliser quand ma paillasse était trop en bazar, et dont la douceur et la gentillesse sont inégalables. Sestina, ma confidente dans les moments où j'en avais marre, mon amie, merci d'avoir ramené le soleil italien dans le labo. Christel, ma grande sœur de labo, qui m'a appris tellement de choses ; qui m'a prêté son Laemli et sa pince à WB et son PBS et... dans les moments de disette ; confidente, aussi ; fournisseuse, avec Sestina, de pyjamas et de bodys et par-dessus tout une femme d'une gentillesse incroyable, merci pour tout et bonne continuation avec ton titre de Docteur !

Laura, Julie et Isabelle, mes copines de labo, devenues des amies, grâce à qui ces trois années ont été plus douces. Laura, qui pleure devant un photophore, mais qui sait toucher sans se

faire toucher, tu es devenue une amie chère et je sais qu'on gardera contact (surtout si tu continues à habiter près de chez moi, j'ai souvent besoin d'une baby-sitter...). Julie, la relève des thésards, n'hésite pas à me contacter si tu as un doute sur une dilution. J'ai été ravie de partager les paillasses du fond et les chocolats et autres bonbons avec toi. Merci pour ta patience quand je te raconte ma vie, ton humour que j'adore et pour ces autocollants du PSG. Merci pour tes corrections, aussi !

Isabelle enfin, je finis par toi parce que tu es celle sans qui je n'aurai certainement pas terminé cette thèse. Ta bonne humeur, ta joie de vivre de tous les instants, ton humour, tes « la fille de la voisine du cousin de mon frère », tes rappels d'anniversaire, ta personne entière ont rendu cette thèse possible. Dans les moments de doute c'est ta présence qui m'a remonté le moral et aujourd'hui j'espère pouvoir te rendre un peu la pareille même si rien n'est comparable, évidemment. Je te dédie cette thèse, car elle ne serait pas sans toi, et je te redis que je t'aime très fort !

Et puis tous les autres membres de l'équipe 5 : Elena, qui va prendre la relève de ce projet et grâce à laquelle je donne des lentilles à ma fille, je te souhaite bonne chance dans ta vie professionnelle et personnelle ! Anne, grâce à qui (ou à cause je ne sais pas trop...) je me suis mise à courir ; Chiara, qui m'a donné des frissons avec sa reprise de I Still Loving You ; Massiré, dont la gentillesse et les tours de bras resteront gravés dans ma mémoire, Nathalie (cette jupe te va très bien !) qui m'a redit avec une infinie patience que l'actine se diluait au 1/5000, Amédée, on a commencé nos thèses ensemble dans un passé lointain ! J'espère que la nouvelle page de ta vie sera aussi belle que tu le souhaites ! Sofia, pour la fourniture en thé à la menthe et autres pâtisseries et Stéphanie avec qui je partage une certaine répugnance de la faute d'orthographe et des espaces en trop, j'espère que je n'en ai pas laissés ici ! Merci à vous tous également pour vos conseils scientifiques.

Merci aussi à tous les occupants du 105, rencontrés de près ou de loin. Je pense en particulier à Mathilde (et ton caniche et ton rire), à Aurore, à Corinne, à Maria-Grazia (la plus belle), à Jordan, à Stéphanie, à David, à Thibaut (et ces très bons moments dans la cuisine...), à Lidia et Soraya, pour les commandes et dépannages, Zofia, Gillian, Florence, Jean-Rémy, Bruno, Damien, Mélanie (dépanneuse officielle de mix RT), Solène, Solenne (je ne sais toujours pas laquelle est laquelle...), Frédérique, Gaëlle, Wladimir, Leandro ... bref, vous tous qui faites que ce centre de recherche est aussi un lieu de rencontres et d'échanges.

Ces trois années auraient également été plus dures sans le soutien de mes proches. Je remercie donc mon amie Marielle (et Marie-Hélène sans laquelle nous ne nous serions jamais parlé...),

qui m'a motivée à renforts de bières, de chips et de restos mexicains et en me racontant ses malheurs de labo. Merci pour tout !

Je remercie également la team GGDR et en particulier Julien, Sylvie, Aurélie M., Aurélie P., Jérôme, Nico, Romain, Simon et tous les autres, pardon de ne pas vous citer tous, qui m'ont fait oublier la thèse le temps de soirées mémorables. Merci aussi à Romain, Nadia et Maxime, pour les mêmes raisons.

Je remercie aussi ma famille, mes grands-parents, émus quand je passe dans le journal pour l'opération 1000 chercheurs dans les écoles, c'est une réussite de les avoir rendus fiers de moi. Oriane et Mathieu, merci de m'avoir permis d'être tata et d'être là, simplement. Léna et Eloan, je vous aime très fort. Bastien, merci pour ton humour et pour ton intelligence qui m'impressionne toujours un peu plus, ce qui amène des débats forts intéressants autour du vin rouge de la table parentale. Tous je vous aime profondément.

Un merci infini à mes parents, qui m'ont toujours soutenue sans poser de questions. Financièrement d'une part, scolairement aussi mais surtout moralement. Vous nous avez inculqué la curiosité de ce qui nous entoure, l'amour de la lecture et l'importance du bonheur. Nous avons eu la chance d'avoir des parents formidables à tout point de vue et pour ça je vous remercie. J'espère élever nos enfants dans le même amour que celui que vous nous avez donné.

Merci aussi, d'avoir pris le temps de relire ce manuscrit !

Je finirais en remerciant Clément, mon ami, mon confident, mon amour. Celui qui est devenu mon mari pendant cette thèse. Merci pour tout, ton soutien infailible, même quand je suis insupportable et ça arrive souvent, d'avoir géré la maison dans les moments chauds, de ton amour qui me porte et me rassure et surtout merci de nous avoir permis d'avoir notre Louise, ce concentré d'amour qui nous apporte un peu plus de bonheur tous les jours. Je vous aime.

Qui que vous soyez, je vous souhaite une bonne lecture et j'espère profondément que ce manuscrit aura pu vous transmettre quelque chose.

Sommaire

Remerciements	1
Sommaire	4
Liste des figures et tableaux	6
Abréviations	7
Chapitre 1 : Introduction	
Prologue	11
I. Le muscle strié squelettique : de la physiologie à la pathologie	13
I.1 Structure du muscle squelettique	13
I.1.1 Du muscle entier aux myofilaments	13
I.1.2 Organisation cellulaire de la fibre musculaire.....	15
I.1.3 Couplage excitation-contraction	16
I.1.4 DAPC	19
I.2 La Dystrophine	21
I.2.1 Le gène DMD	21
I.2.2 L'isoforme musculaire : Dp427M.....	23
I.3 Les dystrophinopathies	24
I.3.1 Dystrophie musculaire de Duchenne.....	24
I.3.2 Dystrophie musculaire de Becker	26
I.3.3 Génétique des dystrophinopathies.....	26
I.3.4 Altérations de la Dystrophine : impact sur la fibre musculaire.....	28
I.3.5 Thérapies des dystrophinopathies	30
II. Nitrique Oxyde Synthase (NOS)	36
II.1 Transcrits et isoformes de nNOS	36
II.2 Mécanismes de synthèse de l'oxyde nitrique (NO).....	38
II.3 Fonctions de l'oxyde nitrique (NO) dans le muscle squelettique.....	40
II.4 Impacts de l'altération de la Dystrophine sur nNOS	42
II.4.1 Impacts sur le développement du muscle et sa croissance.....	43
II.4.2 Impacts sur la résistance du muscle à la fatigue.....	43
II.5 Traitements par NO dans la DMD.....	44
II.5.1 Restauration de nNOS	44
II.5.2 Supplémentation en nitrate	45
II.5.3 Supplémentation en L-arginine	45
II.5.4 Inhibition de l'activité phosphodiesterase	46

III. Les ARNs non-codants.....	47
III.1 Les micro-ARNs.....	47
III.1.1 Biogenèse des miARNs.....	47
III.1.2 Appariement miARN-ARNm	49
III.1.3 Mécanismes de répression.....	50
III.1.4 Modulation transcriptionnelle	53
III.1.5 miARNs dans le muscle	54
III.1.6 Modulation artificielle des miARNs	56
III.2 Les longs ARN non-codants (lncARNs)	59
III.2.1 Mécanismes de régulation.....	59
III.2.2 lncARNs dans les dystrophinopathies.....	61
Objectifs	64
Chapitre 2 : Résultats et Discussions	
I. Identification de miARNs régulant nNOS dans un contexte dystrophique	68
I.1 Hypothèse	68
I.2 Résumé	68
I.3 Article	69
I.4 Expériences <i>in vivo</i>	98
I.4.1 Matériels et méthodes.....	98
I.4.2 Résultats	99
I.5 Discussion.....	103
II. Identification de différences de profils de lncARNs chez les patients BMDdel45-55.....	107
II.1 Hypothèse	107
II.2 Matériels et méthodes	107
II.3 Résultats.....	109
II.4 Discussion.....	111
III. Hypothèse structurale DMD/nNOS	113
III.1 Hypothèse	113
III.2 Résumé	113
III.3 Article	113
III.4 Discussion.....	157
III.5 Contribution au projet.....	157
Chapitre 3 : Conclusions et perspectives	
Bibliographie	165

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Structure du muscle squelettique..	15
Figure 2 : Organisation cellulaire de la fibre musculaire..	16
Figure 3 : Représentation schématique du processus de couplage excitation-contraction-relaxation (a) et du mécanisme de contraction (b).	18
Figure 4 : Complexe protéique associé à la Dystrophine (DAPC).	21
Figure 5 : Différents transcrits et isoformes du gène DMD.	22
Figure 6 : Structure et interactions de l'isoforme musculaire de la Dystrophine.	24
Figure 7 : Marquage de la Dystrophine et histologie de muscle de patient atteint de DMD. ..	26
Figure 8 : Schéma de la Dystrophine et graphique présentant la corrélation entre localisation de la mutation et le phénotype associé.	27
Figure 9 : Mécanismes physiopathologiques de la DMD.	30
Figure 10 : Principe du saut d'exon thérapeutique (a) et structures chimiques des oligonucléotides antisens (b).	33
Figure 11 : Principe du système CRISPR/Cas9.	34
Figure 12 : Structures de la Dystrophine et de la microdystrophine MD1.	35
Figure 13 : Structure des différents transcrits et isoformes de nNOS.	38
Figure 14 : Structure et mécanismes catalytiques de l'oxyde nitrique synthase.	39
Figure 15 : Principales cibles du NO dans le muscle squelettique.	42
Figure 16 : Voie canonique de la biogenèse des microARNs.	48
Figure 17 : Appariement miARN-ARNm.	50
Figure 18 : Mécanisme d'initiation de la traduction.	51
Figure 19 : Mécanismes possibles de répression post-transcriptionnelle par les miARNs.	53
Figure 20 : Modulation artificielle des miARNs.	57
Figure 21 : Mécanismes de régulation des lncARNs dans le muscle.	61
Figure 22 : Représentation schématique des lncARNs décrits dans le gène DMD.	63
Figure 23: Expression du miR-34c et de nNOS chez la souris et modulation du miR-34c dans un modèle cellulaire murin.	100
Figure 24 : Inhibition du miR-34c dans des TA de souris mdx.	93
Figure 25 : Détection des lncARNs décrits dans les introns 44 et 55 à partir de l'ADN de patients BMDdel45-55	110
Figure 26 : Bornes de la délétion dans le gène DMD du patient BMD11.	111
Tableau 1 : Séquences des amorces utilisées dans l'étude des lncARNs, température d'hybridation utilisée (Tm) et taille attendue des amplicons.	108

Abréviations

2'OMe	2'O-Méthyle	eARN	<i>enhancer</i> ARN
2'OMePS	2'O-méthyle phosphorothioate	eIF3/4A/E/G	<i>eucaryotic Initiation Factor</i> 3/4A/E/G
AAV	virus adéno-associé	eNOS	Nitrique oxyde synthase endothéliale
ABD	<i>Actin binding domain</i>	eRF	eucaryotic Releasing Factor
ADP	adénosine diphosphate	FAD	Flavine adénine dinucléotide
Ago	Argonaute	FMN	Flavine mononucléotide
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>	GLUT4	transporteur de glucose 4
AON	oligonucléotide antisens	GMPC	Guanosine Monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique	GRMD	<i>Golden Retriever Muscular</i> <i>Dystrophy</i>
ARNg	ARN guide	GTP	Guanosine Triphosphate
ARNm	Acide ribonucléique messenger	H1/2/3/4	région riche en prolines
ATP	adénosine triphosphate	HDAC	Histone désacétylase
BH ₄	5,6,7,8-tétrahydro-L- bioptérine	iNOS	Nitrique oxyde synthase inductible
BMD	Dystrophie musculaire de Becker	iPSC	Cellules souches pluripotentes induites
Ca ²⁺	ion calcium	IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
CaM	Calmoduline	K19	Kératine 19
Cas9	<i>CRISPR associated protein 9</i>	kb/Mb	kilo/megabase
CH	Domaine d'homologie à la calponine	kDa	kiloDalton
CK	Créatine kinase	LBD	<i>Lipid binding domain</i>
CREB	C-AMP Response Element- binding protein	LNA	<i>Locked Nucleic Acid</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly</i> <i>Interspaced Short</i> <i>Palindromic Repeats</i>	lncARN	long ARN non-codant
DAPC	<i>Dystrophin Associated</i> <i>Protein Complex</i>	MD1	Microdystrophine nommée MD1
del45-55	délétion des exons 45 à 55	<i>mdx</i>	<i>X-linked muscular dystrophy</i>
DHPR	récepteur de la dihydropyridine	MHC	<i>Myosin heavy chain</i>
DMD	Dystrophie Musculaire de Duchenne	miARN	micro-ARN
<i>DMD</i>	gène codant la Dystrophine	miR	micro-ARN
dNTP	désoxyribonucléotides	MLC	<i>Myosin light chain</i>
domaine WW	domaine avec 2 tryptophanes	mtNOS	Nitrique oxyde synthase mitochondriale
domaine ZZ	domaine en doigt de zinc	myomiR	micro-ARN spécifique du muscle
DTT	Dithiothreitol	NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
dystromiR	micro-ARN dérégulé dans les dystrophinopathies	NADP+/ NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ox/red

NHEJ	<i>Non-Homologous End-Joining</i>	TLDA	<i>Taqman Low Density Array</i>
NMD	<i>Non-sense mediated RNA decay</i>	Tm	Température d'hybridation
nNOS	Nitrique oxyde synthase neuronale	TRP	<i>Transient receptor potential</i>
NO	Oxyde nitrique	UTR	<i>Untranslated Transcribed Region</i>
<i>NOS1</i>	gène codant nNOS	WGS	<i>Whole genome sequencing</i>
<i>NOS2</i>	gène codant iNOS		
<i>NOS3</i>	gène codant eNOS		
O ₂	dioxygène		
PABP1	<i>polyadenylate-binding protein 1</i>		
PBMC	cellules mononucléées du sang périphérique		
P-bodies	<i>Processing bodies</i>		
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>		
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>		
PGC-1 α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>		
Pi	Phosphate inorganique		
PMO	phosphorodiamidate morpholino oligo		
PPMO	PMO conjugué à un peptide		
queue polyA	queue polyadénylée		
qPCR	PCR quantitative		
RISC	<i>RNA-induced Silencing Complex</i>		
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>		
RyR	récepteur de la ryanodine		
SAXS	<i>Small Angle X-ray Scattering</i>		
SERCA	sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase		
siARN	petit ARN interférent		
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>		
SOCE	<i>Store operated calcium entry</i>		
SRF	<i>Serum Response Factor</i>		
TA	<i>Tibialis Anterior</i>		
tcADN	tricyclo-ADN		

Chapitre 1 : Introduction

Prologue

Les dystrophinopathies de Duchenne et de Becker sont des pathologies lourdes, entraînant une dégénérescence des muscles. Elles sont dues à des mutations dans le gène *DMD*, codant pour la Dystrophine. Plusieurs mécanismes physiopathologiques sont associés à cette maladie dont de nombreux aspects ne sont pas encore expliqués.

Je me suis intéressée dans ce travail à l'étude d'ARN non-codants qui pourraient être impliqués dans les processus pathologiques de ces maladies et notamment à l'analyse de micro-ARNs qui pourraient cibler l'oxyde nitrique synthase de type neuronal (nNOS), une protéine interagissant avec la Dystrophine et associée à des processus physiologiques et pathologiques du muscle squelettique.

Ce manuscrit est écrit en trois chapitres : une synthèse des connaissances sur le muscle squelettique, de la physiologie à la pathologie, sur la nNOS et sur les ARNs non-codants sera faite dans le premier chapitre introductif ; les résultats obtenus seront décrits et discutés dans un second chapitre et une conclusion générale et les perspectives de ce travail seront abordées dans le troisième chapitre.

I. Le muscle strié squelettique : de la physiologie à la pathologie

Trois types de tissus musculaires sont décrits chez l'Homme :

- Les cellules du muscle lisse sont des cellules mononuclées à contraction involontaire. Elles sont présentes dans la paroi des vaisseaux ainsi que dans la paroi musculaire des systèmes respiratoire, digestif, urinaire et génitaux.
- Les cardiomyocytes forment le tissu cardiaque. Ce sont des cellules mononuclées à contraction rythmée et involontaire.
- Le muscle strié squelettique est composé de cellules multinuclées, à contraction volontaire ou réflexe. On le retrouve dans les muscles associés au squelette. C'est ce type musculaire qui sera abordé lors de ce travail.

Le muscle strié squelettique représente 40% de la masse musculaire. Il est impliqué dans un rôle mécanique : transformer l'énergie chimique (les neurotransmetteurs) en énergie mécanique (la contraction) afin de générer de la force pour produire un mouvement ou maintenir une posture. Il a aussi un rôle métabolique puisqu'il sert de lieu de stockage pour les acides aminés et les carbohydrates utilisés par les autres tissus du corps. Il permet également la production de chaleur pour maintenir la température corporelle (Frontera et Ochala, 2015).

I.1 Structure du muscle squelettique

I.1.1 Du muscle entier aux myofilaments

Le muscle squelettique est entouré par une couche de tissu conjonctif dense appelé l'épimysium, qui permet son insertion sur l'os (Frontera et Ochala, 2015) (Figure 1a). Le muscle est composé de groupes de fibres musculaires, organisées en faisceau. Chaque faisceau est entouré par une autre couche de tissu conjonctif appelé périmysium. Une dernière couche de tissu conjonctif entoure chaque fibre musculaire : l'endomysium (Figure 1b). Au sein du tissu musculaire on retrouve également des vaisseaux qui assurent l'approvisionnement en oxygène et en nutriments ainsi que des fibres nerveuses et des cellules immunitaires.

La fibre musculaire est formée par la fusion de cellules mononuclées, les myoblastes, donnant ainsi une fibre multinuclée. Elle est entourée par une membrane cellulaire appelée sarcolemme. Chez l'homme, une fibre mesure une centaine de micromètres de diamètre et peut atteindre plusieurs centimètres de long. Le cytoplasme de la fibre musculaire est nommé

sarcoplasme et est principalement composé de myofibrilles mais aussi d'organites cellulaires tels que l'appareil de Golgi, les mitochondries ou le réticulum sarcoplasmique, qui se trouvent autour des noyaux, en périphérie des fibres. Les myofibrilles sont des structures organisées et caractéristiques, formées par des myofilaments organisés en sarcomères, l'unité contractile du muscle. Les sarcomères sont formés d'une alternance de bandes claires, les bandes I, constituées de filaments fins et de bandes sombres, les bandes A constituées de filaments épais qui se lient aux filaments fins. C'est cette organisation qui donne leur aspect strié aux muscles squelettiques et cardiaque (Figure 1c). Les limites longitudinales d'un sarcomère sont marquées par les stries Z, une ligne dense en microscopie électronique. Les filaments fins se fixent au niveau des stries Z, couvrent les bandes I et s'étendent vers le milieu des sarcomères. Les filaments fins mesurent environ un micromètre et sont composés principalement de filaments d'actine qui forment deux hélices α enroulées l'une sur l'autre. Les filaments d'actine sont parcourus par des complexes de troponine et de tropomyosine qui régulent l'interaction entre filaments fins et épais (Figure 1d). Au niveau des bandes A, les filaments fins interagissent avec les filaments épais composés principalement de myosine, la protéine motrice du sarcomère (Clark *et al.* 2002) (Figure 1c). Les filaments de myosine sont composés de têtes globulaires, les domaines moteurs de la protéine, qui vont interagir avec les filaments fins et de queues qui sont alignées au niveau de la strie M (Figure 1.c et d). Les filaments de myosine sont composés de deux chaînes lourdes (MHC pour *Myosin Heavy Chain*) et de quatre chaînes légères (MLC pour *Myosin Light Chain*). En fonction des facultés nécessaires aux différents types de muscles (exercice intense et court ou effort prolongé par exemple), les isoformes de MHC et de MLC seront différentes ainsi que les combinaisons MHC/MLC (Clark *et al.* 2002).

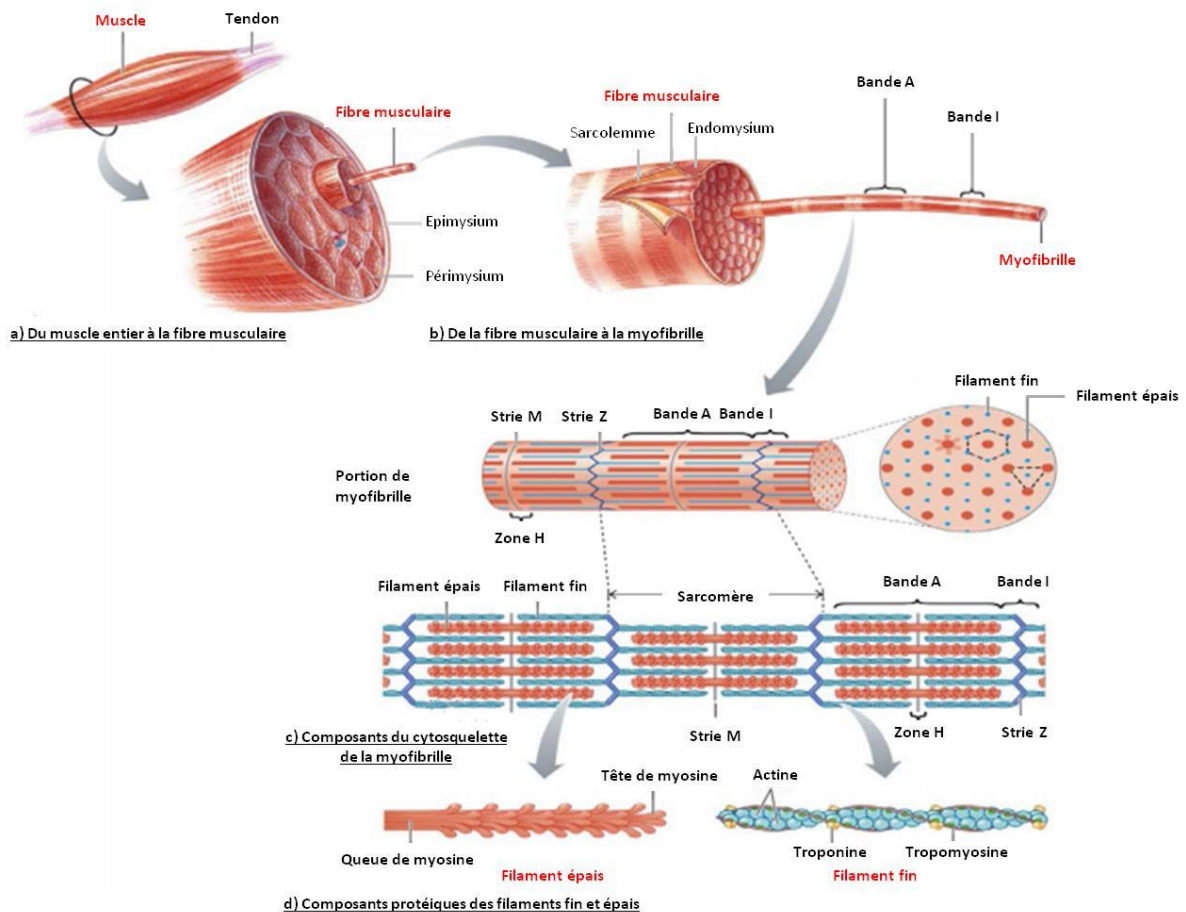


Figure 1 : Structure du muscle squelettique. Le muscle est organisé en faisceau de fibres musculaires (a), composées de myofibrilles (b) qui présentent une structure striée particulière (c) et qui sont composées de filaments fins d'actine et de filaments épais de myosine principalement (d) (adaptée de Frontera et Ochala, *Calcified Tissue International*, 2015).

1.1.2 Organisation cellulaire de la fibre musculaire

Différents composants cellulaires sont retrouvés au sein du sarcoplasme des fibres musculaires, notamment les tubules transverse (tubules T), le réticulum sarcoplasmique et le réseau mitochondrial (Frontera et Ochala, 2015) (Figure 2).

Le tubule T est formé par une invagination du sarcolemme et aura un rôle important dans la conduction du signal nerveux menant à la contraction (cf. I.1.3).

Le réticulum sarcoplasmique est responsable du stockage, du relargage et du recyclage des ions calciques (Ca^{2+}) après l'activation. Le calcium est stocké au niveau des citernes terminales qui correspondent à la fin du réticulum sarcoplasmique. Les deux citernes terminales encadrant un tubule T forment une structure appelée « triade ».

Les mitochondries permettent de produire l'énergie nécessaire à l'action musculaire.

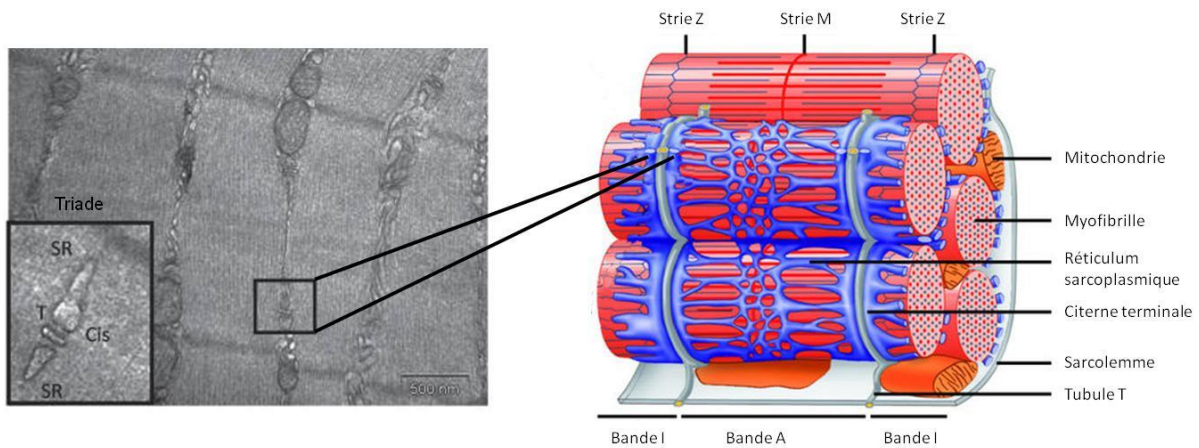


Figure 2 : Organisation cellulaire de la fibre musculaire. Microscopie électronique de coupe de *Tibialis Anterior* de souris. Le sarcolemme de la fibre musculaire contient le réticulum sarcoplasmique (SR), les tubules transverses (T), les citernes terminales (Cis) formant une structure appelée triade et le réseau mitochondrial (adaptée de Piétri-Rouxel et al. EMBO, 2010 et Marieb, *Human Anatomy and Physiology*. 2007, Pearson Education, Inc.).

1.1.3 Couplage excitation-contraction

Le couplage excitation-contraction est le processus qui permet de générer de la force à partir d'une excitation nerveuse.

Le potentiel d'action généré par le nerf va arriver au niveau du sarcolemme (Figure 3a) (1) et entrer à l'intérieur de la fibre musculaire par l'intermédiaire du tubule T (2). Celui-ci est à proximité immédiate de la citerne terminale où le Ca^{2+} est stocké. Les tubules T possèdent à travers leur membrane des récepteurs à la dihydropyridine (DHPR) qui sont des canaux calciques voltage-dépendants (Rebbeck *et al.* 2014). La sous-unité $\alpha 1\text{S}$, sensible au voltage du DHPR va, à l'arrivée de l'influx nerveux, entraîner un changement de conformation qui va permettre l'ouverture des récepteurs à la ryanodine (RyR) présents au niveau des citernes terminales (3). On a alors un relargage massif de Ca^{2+} dans le sarcoplasme. Le calcium ainsi relargué va se fixer au niveau de la troponine C, la sous-unité de la troponine responsable de la liaison avec le Ca^{2+} (4).

Cette fixation de Ca^{2+} va entraîner un déplacement de la tropomyosine qui, au repos, bloque les sites actifs des filaments d'actine. La tête de myosine va ainsi pouvoir se lier à l'actine (Figure 3b). Le relargage de l'Adénosine Diphosphate (ADP) et du Phosphate inorganique (Pi) présents sur la tête de myosine va initier le mouvement de contraction en entraînant une rotation de la tête de myosine, ce qui va permettre un mouvement de l'actine vers la strie M. L'Adénosine Triphosphate (ATP) va ensuite se lier à son site de liaison sur la myosine, qui va alors se détacher de l'actine. La tête de myosine, par une réaction de déphosphorylation de

l'ATP en ADP+Pi va alors se tourner de nouveau et ainsi se fixer à la molécule suivante d'actine.

Le mécanisme de contraction prend fin avec la relaxation, qui intervient grâce au rétablissement de la concentration calcique initiale dans le cytosol. Ceci est effectué grâce aux pompes Ca^{2+} -ATPases SERCA situées sur la membrane du réticulum sarcoplasmique et qui vont pomper le Ca^{2+} dans la lumière du réticulum où il sera de nouveau stocké (MacLennan *et al.* 1997) (Figure 3a) (5).

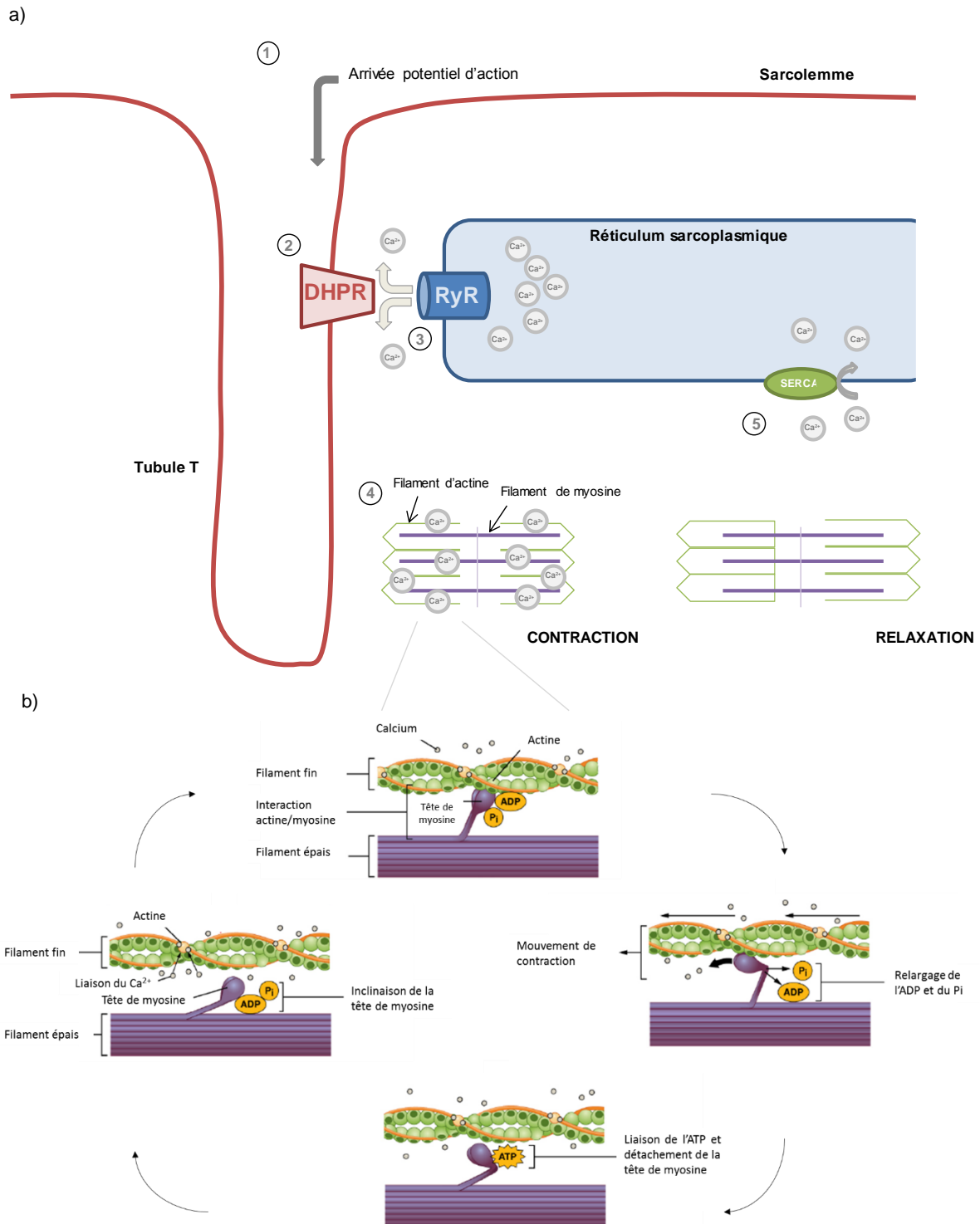


Figure 3 : Représentation schématique du processus de couplage excitation-contraction-relaxation (a) et du mécanisme de contraction (b).(a) Le potentiel d'action va arriver au niveau du sarcolemme (1), entrer à l'intérieur de la fibre par l'intermédiaire des tubules T (2), le voltage va entraîner un changement de conformation des récepteurs à la dihydropyridine (DHPR), qui vont alors permettre l'ouverture des récepteurs à la ryanodine (RyR) entraînant un relargage massif de Ca²⁺ (3). Le Ca²⁺ va alors se lier au niveau de la troponine C (4). La contraction prend fin avec le rétablissement de la concentration initiale en Ca²⁺, possible grâce aux pompes SERCA (5). (b) La fixation de Ca²⁺ entraîne le déplacement de la tropomyosine et ainsi l'accès de la tête de myosine à l'actine qui, par un phénomène ATP-dépendant, va entraîner la contraction de la fibre musculaire (adaptée de Anatomy and Physiology – OpenStax).

Afin de transmettre la force de contraction de façon efficace, les composantes contractiles du sarcomère doivent être liées au sarcolemme, la membrane cellulaire qui enveloppe les myofibrilles. Cette liaison est possible par l'intermédiaire des costamères, des structures qui lient les stries Z et M à la membrane (Peter *et al.* 2011). Les costamères permettent également de maintenir l'intégrité structurale de la membrane musculaire, par l'intermédiaire de trois structures : les contacts focaux qui font intervenir des intégrines, la protéine spectrine du cytosquelette et le complexe protéique lié à la Dystrophine (DAPC pour *Dystrophin-Associated Protein Complex*) qui nous intéressera plus particulièrement dans ce travail.

1.1.4 DAPC

Les filaments d'actine sont reliés à la matrice extra-cellulaire par l'intermédiaire d'un complexe protéique transmembranaire, le DAPC (Ervasti et Campbell, 1993). Ce complexe permet de transmettre la force générée par l'appareil contractile jusqu'au sarcolemme mais aussi de renforcer la membrane et donc de la protéger des stress mécaniques induits par la contraction (Petrof *et al.* 1993).

Le DAPC joue également un rôle dans certaines voies de signalisation, par l'intermédiaire de son interaction avec la Calmoduline, une protéine impliquée dans la survie cellulaire par la voie PI3K/Akt ou de l'oxyde nitrique synthase de type neuronal (nNOS) notamment (*cf.* partie II) (Rando *et al.* 2001).

Le DAPC est composé de plusieurs protéines (Ehmsen *et al.* 2002) (Figure 4) :

- *Dystrophine*

La Dystrophine est liée à l'actine par son extrémité N-terminale et permet l'assemblage du DAPC par son extrémité C-terminale par sa liaison avec les Dystroglycanes, la Syntrophine, la Dystrobrevine et la nNOS (*cf.* I.2). Elle représente un élément central du DAPC puisqu'une déficience en Dystrophine entraîne la perte de ses protéines associées (Ohlendieck *et al.* 1993) (*cf.* I.3).

- *Laminine 2*

La Laminine 2 est une protéine structurale de la lame basale, une structure particulière de la matrice extracellulaire.

- *Dystroglycanes*

Le complexe des Dystroglycanes permet la liaison à travers le sarcolemme de la Laminine et de la Dystrophine. La sous-unité α est extracellulaire et se lie à la Laminine tandis que la

sous-unité β traverse la membrane pour se lier à la Dystrophine (Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.* 1992). L'absence de Dystroglycane est létale au stade embryonnaire chez la souris, suggérant un rôle essentiel au cours du développement (Williamson *et al.* 1997).

- *Sarcoglycane et Sarcospane*

Les Sarcoglycane et le Sarcospane sont des protéines transmembranaires étroitement liées. Le complexe des Sarcoglycane est composé de cinq protéines transmembranaires : les Sarcoglycane α , β , γ , δ et ϵ (Ehmsen *et al.* 2002). Le Sarcoglycane γ peut interagir directement avec la Dystrophine. Une mutation touchant l'un des Sarcoglycane entraîne la perte de tous les autres. Les dystrophies musculaires des ceintures 2D, DE, 2C et 2F sont dues à l'absence des Sarcoglycane α , β , γ ou δ respectivement (Bushby *et al.* 1999).

Le Sarcospane est une protéine à quatre domaines transmembranaires, dont l'absence n'affecte pas le maintien du DAPC et n'entraîne pas de dystrophie musculaire (Lebakken *et al.* 2000).

- *α -dystrobrevine*

L' α -dystrobrevine est liée à la Dystrophine et à la Syntrophine. Cependant une liaison peut également être possible avec le complexe des Sarcoglycane puisqu'en l'absence de leurs sites de liaison sur la Dystrophine, la Dystrobrevine et la Syntrophine restent liées au DAPC (Crawford *et al.* 2000).

- *Syntrophine*

La Syntrophine est liée à la Dystrophine, à la Dystrobrevine et à nNOS et peut également interagir avec des kinases, suggérant un rôle modulateur des voies de signalisation.

- *nNOS*

La nNOS est liée à la Dystrophine et aux Syntrophines et permet la synthèse de l'oxyde nitrique (NO) (*cf.* II.1 et 2).

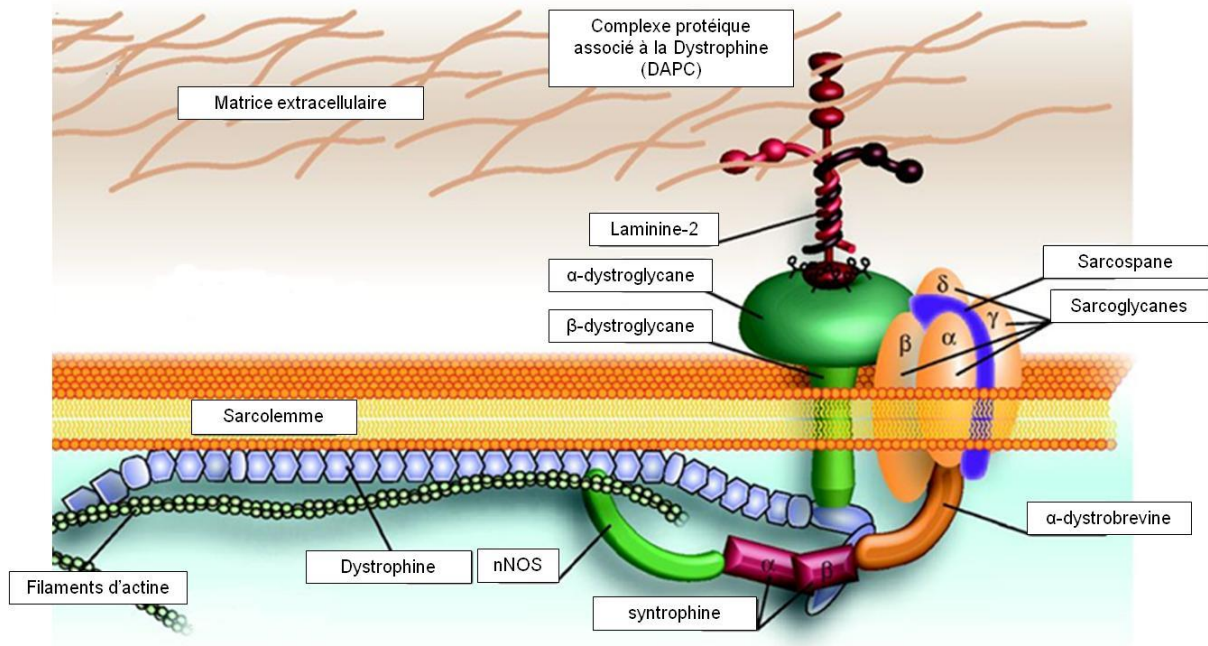


Figure 4 : Complexe protéique associé à la Dystrophine (DAPC) (adaptée de Berger et Currie, *Disease Models & Mechanisms*, 2012).

I.2 La Dystrophine

I.2.1 Le gène *DMD*

La Dystrophine est codée par le gène *DMD* localisé sur le chromosome X au niveau du locus Xp21 (Monaco *et al.* 1986 ; Koenig *et al.* 1987). Au niveau génomique, *DMD* a une taille de près de 2,5 Mb, ce qui en fait le plus grand gène humain connu. Cependant, il est composé à plus de 99% de séquences non-codantes puisque son transcrit le plus long a une taille de 14 kb (Koenig *et al.* 1988).

Sept transcrits différents ont été décrits (Sadoulet-Puccio et Kunkel, 1996 ; Muntoni *et al.* 2003). Trois transcrits ont le même nombre d'exons (79) et vont donner des isoformes de même taille (427 kDa) mais dérivent de trois promoteurs indépendants exprimés dans des tissus différents (Figure 5) : le cerveau (B), le muscle (M) et les cellules de Purkinje (P). Ils possèdent chacun un premier exon unique et les exons restants sont communs.

Le gène *DMD* présente également au moins quatre promoteurs internes, dont les noms correspondent aux tissus principaux où ces transcrits s'expriment. Le promoteur R est ainsi exprimé dans la rétine. Le transcrit commence au niveau de l'exon 30 et donnera une isoforme de 260 kDa (Dp260). Le promoteur B3 est exprimé dans le cerveau, dans la rétine et dans les reins et donne un transcrit qui commence au niveau de l'exon 45, donnant une

isoforme de 140 kDa (Dp140). Le promoteur S est exprimé dans les nerfs périphériques (cellules de Schwann). Il donne un transcrit commençant au niveau de l'exon 56 et produisant une protéine de 116 kDa (Dp116). Enfin, le promoteur G (Général) s'exprime dans la plupart des tissus sauf le muscle squelettique. Il donne un transcrit démarrant au niveau de l'exon 63 et une isoforme de 71 kDa (Dp71).

Les isoformes courtes ne possèdent pas le domaine de liaison à l'actine à l'extrémité N-terminale.

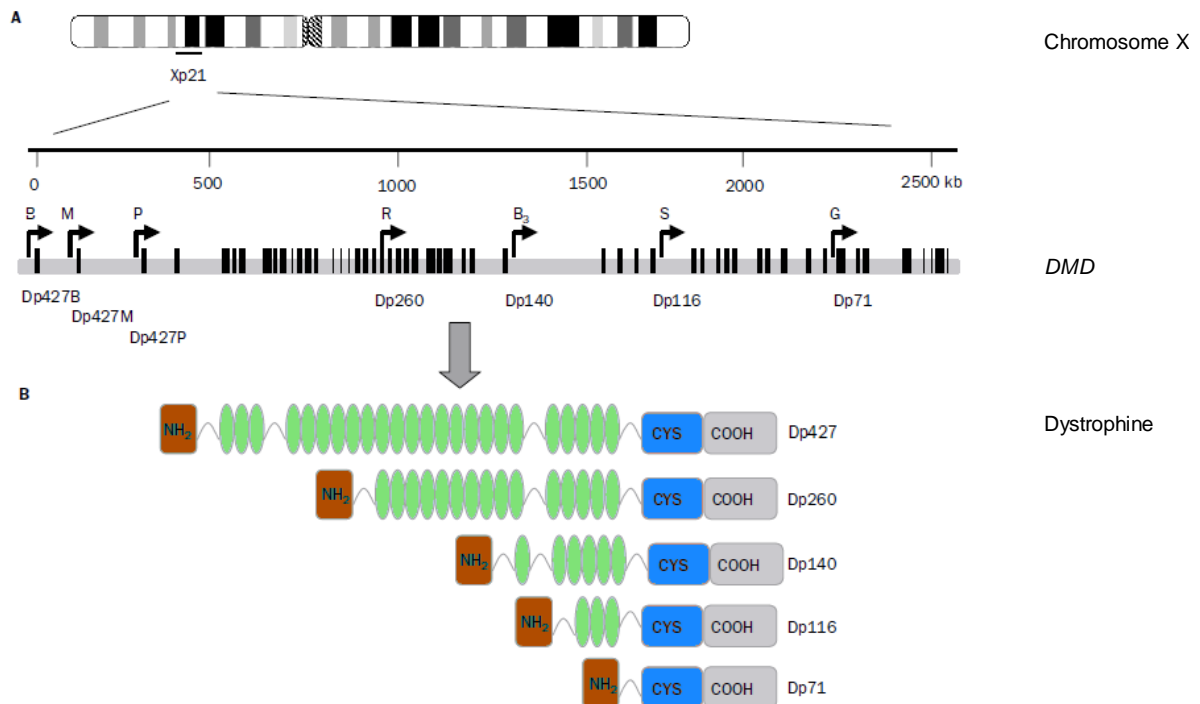


Figure 5 : Différents transcrits et isoformes du gène DMD. **A.** Organisation génomique de *DMD*, localisé sur le locus Xp21. Les blocs noirs représentent les exons. Les flèches représentent les différents promoteurs exprimés dans le cerveau (B) qui donne l'isoforme Dp427B, le muscle (M) Dp427M, les cellules de Purkinje (P) Dp427P, la rétine (R) Dp260, le système nerveux central et les reins (B₃) Dp140, les cellules de Schwann (S) Dp116 et dans la plupart des tissus sauf le muscle (G) Dp71. **B.** Structure des différentes isoformes de la Dystrophine : domaine N-terminal (orange), répétitions de type spectrine (vert), domaine riche en cystéines (bleu) et domaine C-terminal (gris) (adaptée de Muntoni et al. *Lancet Neurol*, 2003).

En plus des différentes isoformes dues à différents promoteurs, des mécanismes d'épissage alternatif du gène *DMD* sont également décrits (Feener et al. 1989 ; Surono et al. 1999).

I.2.2 L'isoforme musculaire : Dp427M

L'isoforme musculaire de la Dystrophine est une protéine de 427 kDa, localisée sous le sarcolemme au niveau des costamères, au sein du DAPC.

Elle est composée de quatre domaines protéiques (Figure 6) :

- L'extrémité N-terminale codée par les exons 1 à 8, possède un domaine de liaison à l'actine (ABD1) formé par deux domaines d'homologies à la Calponine (CH), séparés par une hélice α (Koenig *et al.* 1988 ; Norwood *et al.* 2000). Ce domaine permet également la liaison de filaments intermédiaires contenant de la kératine (K19) (Stone *et al.* 2005).

- Le domaine central (rod-domain) est codé par les exons 10 à 61 et comporte 24 répétitions de type spectrine d'environ 100 acides aminés chacune (Koenig *et al.* 1988). Le domaine central interagit avec de nombreux éléments dont les microtubules (Belanto *et al.* 2014), PAR-1b qui établit et maintient la polarité des cellules en participant à la régulation de la stabilité des microtubules (Yamashita *et al.* 2010), les lipides membranaires par l'intermédiaire de deux sites de liaison aux lipides (LBD1 et LBD2) (Le Rumeur *et al.* 2003 ; Legardinier *et al.* 2009), un domaine de liaison à l'actine filamentueuse (ABD2) (Amann *et al.* 1998), un domaine de liaison à la Symenine, une protéine des filaments intermédiaires (Bhosle *et al.* 2006) et enfin un domaine de liaison à nNOS (Lai *et al.* 2009).

Le domaine central est entrecoupé de 4 régions charnières riches en prolines (H1 à H4) qui assurent la flexibilité et l'élasticité de la Dystrophine (Koenig et Kunkel, 1990).

- La région riche en cystéines est codée par les exons 63 à 69. Elle permet notamment la liaison à la Dystrophine du β -dystroglycane par l'intermédiaire de plusieurs domaines : un domaine WW, qui doit son nom à la présence de deux résidus tryptophane très conservés, deux domaines de liaison au Ca^{2+} (EF-Hands : EFH1 et 2) et un domaine en doigt de zinc (ZZ) (Rentschler *et al.* 2005 ; Huang *et al.* 2000 ; Ishikawa-Sakurai *et al.* 2004).

- La région C-terminale permet la liaison des Syntrophines et de la Dystrobrévine (Newey *et al.* 2000).

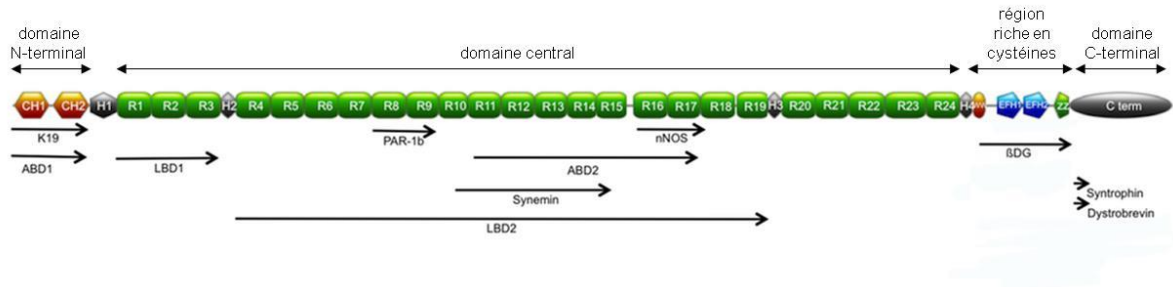


Figure 6 : Structure et interactions de l'isoforme musculaire de la Dystrophine. La Dystrophine est composée d'un domaine N-terminal formé de 2 domaines d'homologie à la calponine (CH) ; d'un domaine central composé de 24 répétitions de type spectrine (R1 à R24) et de 4 régions charnières (H1 à H4) ; d'une région riche en cystéines avec un domaine possédant 2 tryptophanes conservées (WW), 2 domaines de liaison au Ca^{2+} (EFH) et un domaine en doigt de zinc (ZZ) et une région C-terminale. Les flèches sous le schéma indiquent les protéines interagissant avec la Dystrophine et leur site d'interaction (*adaptée de edystrophin.genouest.org*).

De par son rôle majeur au sein du DAPC (*cf.* I.1.4), la Dystrophine a une action directe sur le maintien de l'intégrité du muscle lors de la contraction ainsi que sur les voies de signalisation. Son absence ou la modification de sa structure entraînent des pathologies musculaires appelées dystrophinopathies.

I.3 Les dystrophinopathies

Les dystrophinopathies regroupent un large spectre de pathologies dues à des mutations dans le gène *DMD*, codant pour la Dystrophine (Monaco *et al.* 1986 ; Koenig *et al.* 1987). Le début du spectre inclut des phénotypes modérés avec une augmentation du niveau de Créatine Kinase (CK) dans le sérum, une protéine qui est normalement dans le muscle mais qui se retrouve dans le sang en cas de lésion musculaire ou d'inflammation et des crampes musculaires avec une myoglobinurie. L'autre extrémité du spectre phénotypique inclut des symptômes sévères dont une dégénérescence progressive des muscles, avec des pathologies classées comme cardiomyopathies associées à *DMD* si le cœur est touché en premier lieu et en dystrophies musculaires de Duchenne (DMD) et de Becker (BMD) si les muscles squelettiques sont affectés au préalable. Ce sont ces dernières classes de pathologies qui nous intéresseront pour ce travail.

I.3.1 Dystrophie musculaire de Duchenne

La Dystrophie musculaire de Duchenne est une pathologie récessive liée à l'X, due à des mutations dans le gène *DMD*. La prévalence de cette maladie est d'une naissance de garçons sur 3500 à une sur 6000 (Emery *et al.* 1991).

La DMD entraîne une dégénérescence progressive des muscles. Les premiers symptômes sont visibles entre les âges de 2 à 5 ans et l'on distingue ensuite plusieurs stades dans la pathologie dont l'âge d'apparition varie selon les patients (Bushby *et al.* 2010) :

- Le stade ambulatoire précoce : le patient marche mais présente certains signes typiques de la maladie dus au fait que les membres inférieurs sont touchés en premier : la manœuvre de Gowers (décrite en 1895 par William Gowers), une manœuvre particulière pour se relever du sol et qui oblige l'enfant à utiliser ses mains et ses bras du fait de la faiblesse musculaire des hanches et des cuisses ; une démarche dandinante (dite marche de Duchenne) et une marche sur la pointe des pieds. Le patient présente également une pseudo-hypertrophie des mollets due au remplacement du tissu musculaire par du tissu adipeux ou fibreux et à des cycles intenses de régénération. Le patient peut encore monter les escaliers mais généralement en n'alternant pas les pieds.

- Le stade ambulatoire avancé : le patient a de plus en plus de difficultés à marcher, à se relever du sol et à monter les escaliers. A ce stade les muscles respiratoires et cardiaques ne sont en général pas ou faiblement atteints.

- Le stade non-ambulatoire précoce : un fauteuil roulant devient nécessaire pour le patient qui se tient encore assis normalement. Une scoliose peut apparaître, due à l'affaiblissement des muscles du dos. Les fonctions respiratoires et cardiaques peuvent commencer à se détériorer.

- Le stade non-ambulatoire avancé : les membres supérieurs sont atteints, le maintien de la posture assise est dégradé et des complications digestives, respiratoires et cardiaques surviennent. L'espérance de vie est de l'ordre de 30 ans.

Ces symptômes musculaires peuvent s'accompagner de problèmes d'apprentissage et comportementaux dus d'une part à la perte d'autonomie mais également à l'absence de l'isoforme de la Dystrophine présente dans le cerveau (Dp140).

La première étape du diagnostic de ces maladies est un dosage de la CK. Dans le cas des dystrophinopathies on retrouve un taux de CK très élevé dans le sang des malades.

Ensuite un séquençage du gène *DMD* est effectué sur les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) afin de détecter une mutation. Si le séquençage ne donne rien, une biopsie sera effectuée afin de visualiser la présence ou non de Dystrophine par Western-blot ou immunohistochimie (Figure 7a) et également de détecter la présence de fibres nécrotiques et en régénération, d'inflammation, de fibrose et de tissu adipeux (Figure 7b).

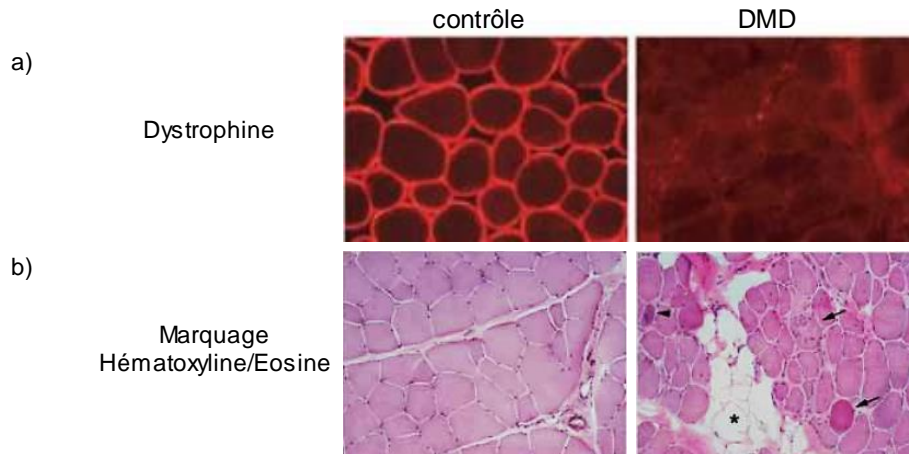


Figure 7 : Marquage de la Dystrophine et histologie de muscle de patient atteint de DMD. **a)** Immunomarquage de la Dystrophine (en rouge) sur une coupe de muscle d'un sujet contrôle (à gauche) et d'un patient DMD (à droite). **b)** Marquage à l'hématoxyline et à l'éosine d'une coupe de muscle d'un sujet contrôle (à gauche) et d'un patient DMD (à droite). Les caractéristiques d'un muscle dystrophique sont observables : nécrose des fibres (flèches), réduction de la taille des fibres, infiltration de tissu adipeux (astérisque) (*adaptée de Skuk et al. Expert Opinion on Biological Therapy, 2004*).

1.3.2 Dystrophie musculaire de Becker

La BMD a été individualisée de la DMD en 1955 par Becker. La prévalence de la BMD varie d'une naissance de garçon sur 18 000 à une sur 30 000. Elle est donc plus rare que la DMD. Les symptômes sont généralement les mêmes que pour la DMD mais apparaissent plus tardivement.

La BMD présente des symptômes et un âge d'apparition bien plus variable que la DMD, on observe en effet une hétérogénéité des phénotypes allant de simples crampes jusqu'à un phénotype DMD, même au sein d'une même famille. La marche reste possible au-delà de 40 ans dans plus de la moitié des cas (Bushby et Gardner-Medwin, 1993).

1.3.3 Génétique des dystrophinopathies

Les dystrophies de Duchenne et de Becker sont deux pathologies dues à des mutations dans le même gène *DMD* qui code la Dystrophine. Ce sont des maladies récessives liées à l'X et qui touchent donc essentiellement des garçons. Les femmes porteuses sont normalement asymptomatiques mais certains cas de femmes présentant une DMD ont été recensés en cas d'inactivation de l'autre chromosome X ou de translocation d'une partie du chromosome X sur un autre chromosome (Giliberto *et al.* 2014).

La DMD est due à des mutations qui entraînent un décalage du cadre de lecture, menant à l'apparition de codons stop prématurés et donc à l'absence totale de Dystrophine. La BMD

quant à elle est due à des mutations qui conservent le cadre de lecture, la protéine est donc tronquée mais présente (Monaco *et al.* 1988 ; Koenig *et al.* 1989).

Cette règle présente en fait quelques exceptions d'un point de vue du phénotype. Une étude a par exemple montré que sur une cohorte de 1111 patients avec des mutations dans le gène *DMD*, 87% des mutations entraînant un décalage du cadre de lecture sont effectivement associées à un phénotype DMD mais seulement 56% des mutations qui conservent le cadre de lecture sont associées à un phénotype BMD (Flanigan *et al.* 2009). La sévérité du phénotype va, par exemple, varier avec la localisation de la mutation (Figure 8). En effet, une mutation décalant le cadre de lecture après l'exon 74 peut donner un phénotype BMD (Kerr *et al.* 2001 ; Aartsma-Rus *et al.* 2006). Une des explications possibles serait qu'une mutation située loin du début du gène entraînerait une efficacité moindre du mécanisme de surveillance de l'ARN messager (ARNm) (NMD pour *Non-sens Mediated mRNA Decay*) qui, normalement, dégrade l'ARNm qui possède un codon stop prématuré. On a alors une Dystrophine restante, en partie fonctionnelle. Il est également montré que certaines mutations impactent des sites d'épissage, permettant ainsi un saut de l'exon muté, la présence de Dystrophine et donc un phénotype BMD (Ginjaar *et al.* 2000). Par ailleurs, des mutations conservant le cadre de lecture peuvent donner un phénotype DMD si la mutation est une délétion trop large pour donner une Dystrophine fonctionnelle ou si elle impacte un domaine essentiel comme les sites de liaison à l'actine ou le domaine riche en cystéine (Aartsma-Rus *et al.* 2006).

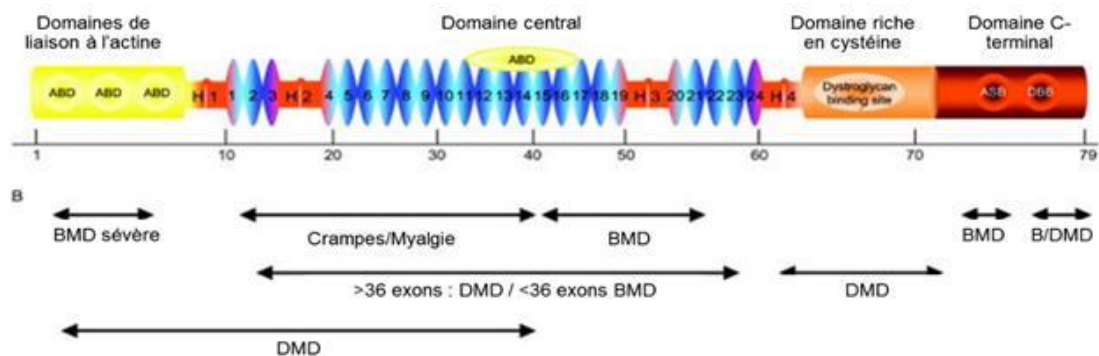


Figure 8 : Schéma de la Dystrophine et graphique présentant la corrélation entre localisation d'une délétion conservant le cadre de lecture et le phénotype associé. ABD : domaines de liaison à l'actine, H : régions charnières, ASB : domaine de liaison à la syntrophine, DSB : domaine de liaison à la dystrobrevine. Les traits gris verticaux indiquent la position des exons indiqués (adaptée de Aartsma-Rus *et al.* Muscle & Nerve, 2006).

Enfin, il a également été montré que des phénotypes très différents pouvaient être associés à une mutation identique. C'est le cas de la cohorte de patients que nous étudions dans ce

travail. Ces patients ont en effet une délétion des exons 45 à 55, c'est-à-dire une mutation qui conserve le cadre de lecture, mais présentent des phénotypes allant d'asymptomatiques à sévères (Aartsma-Rus *et al.* 2006 ; Gentil *et al.* 2012). Ce type de cohortes indique la nécessité d'étudier des éléments modulateurs autres que la présence ou non de Dystrophine.

1.3.4 Altérations de la Dystrophine : impact sur la fibre musculaire

L'absence ou l'altération de la Dystrophine entraînent une dégénérescence de la fibre musculaire due à plusieurs mécanismes.

- *Impacts mécaniques d'une absence de Dystrophine*

La Dystrophine est une protéine centrale dans le DAPC, le complexe protéique qui relie les myofilaments d'actine du sarcomère à la matrice extracellulaire (*cf.* I.1.4). Ce complexe permet le maintien de l'intégrité de la fibre et de sa membrane durant la contraction musculaire.

Une absence de Dystrophine entraîne une diminution de l'expression de ses protéines associées (Ohlendieck *et al.* 1993). Le lien entre sarcolemme et myofibrilles n'étant plus assuré, l'action mécanique des contractions musculaires génère l'apparition de microlésions au niveau du sarcolemme (Mokri et Engel, 1975) (Figure 9.1). Cela entraîne une perméabilité accrue de la membrane (Hamer *et al.* 2002), provoquant ainsi des fuites d'enzymes solubles telles que la CK mais aussi une augmentation intracellulaire de Ca^{2+} (Bodensteiner et Engel, 1978).

- *Dérégulation de l'homéostasie calcique*

Le calcium cytosolique est augmenté au cours de la DMD (Bodensteiner et Engel, 1978). Cette élévation de Ca^{2+} intracellulaire provoque l'activation de plusieurs voies de signalisation, notamment la voie de la calpaïne, une protéinase dépendant du Ca^{2+} qui dégrade les protéines et participe à la nécrose des cellules (Vallejo-Illarramendi *et al.* 2014 ; Péréon *et al.* 2015).

L'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} est due à plusieurs mécanismes parmi lesquels :

- Les microlésions du sarcolemme dues à l'absence de protéines du DAPC (*cf.* paragraphe précédent) (Figure 9.1).
- Les canaux de fuite physiologiquement présents au niveau du sarcolemme mais dont l'ouverture est accentuée dans la DMD (Alderton et Steinhardt, 2000) (Figure 9.2).
- Les canaux mécanosensibles TRP (pour *Transient Receptor Potential*) (Figure 9.3) dont

l'activité est augmentée dans la DMD, peut-être du fait d'étirements excessifs de la membrane qui n'est plus rattachée aux myofibrilles. Ces canaux sont exprimés sur le sarcolemme et participent à la régulation du calcium. Ils sont associés au DAPC par l'intermédiaire de l' α -syntrophine, dont l'expression est diminuée en absence de Dystrophine (Vallejo-Illarramendi *et al.* 2014 ; Péréon *et al.* 2015).

- Les canaux SOCE (pour *Store Operated Calcium Entry*) (Figure 9.4) dont l'activité est également augmentée dans la DMD. Les canaux SOCE gèrent le niveau de stockage du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique et permettent notamment le réapprovisionnement du réticulum sarcoplasmique lors de contractions répétées. Ces complexes correspondent au couplage de deux structures : STIM1, une protéine transmembranaire du réticulum sarcoplasmique qui va détecter le Ca^{2+} et contrôler l'ouverture du canal Orai1 localisé dans le tubule-T (Vallejo-Illarramendi *et al.* 2014 ; Pereon *et al.* 2015).

- *Stress oxydatif*

Une production importante de radicaux libres (ROS pour *Reactive Oxygen Species*) est observée au cours de la DMD (Figure 9.5) (Terrill *et al.* 2013). Elle est due à une activité plus importante de la NADPH oxydase membranaire mais également aux conséquences de l'élévation du calcium intracellulaire sur les mitochondries. Les ROS vont participer à l'activation de mécanismes d'inflammation par l'intermédiaire de la voie $NF-\kappa\beta/TNF\alpha$ (Péréon *et al.* 2015).

- *Perturbations de la NO synthase (NOS)*

La synthèse de l'oxyde nitrique est également perturbée dans la DMD (Figure 9.6), notamment du fait de la réduction de l'expression ainsi que de la perte de la localisation sarcolemmale de nNOS, protéine d'intérêt de ce travail. Les causes et conséquences de la perturbation des protéines NOS seront abordées dans la partie II.

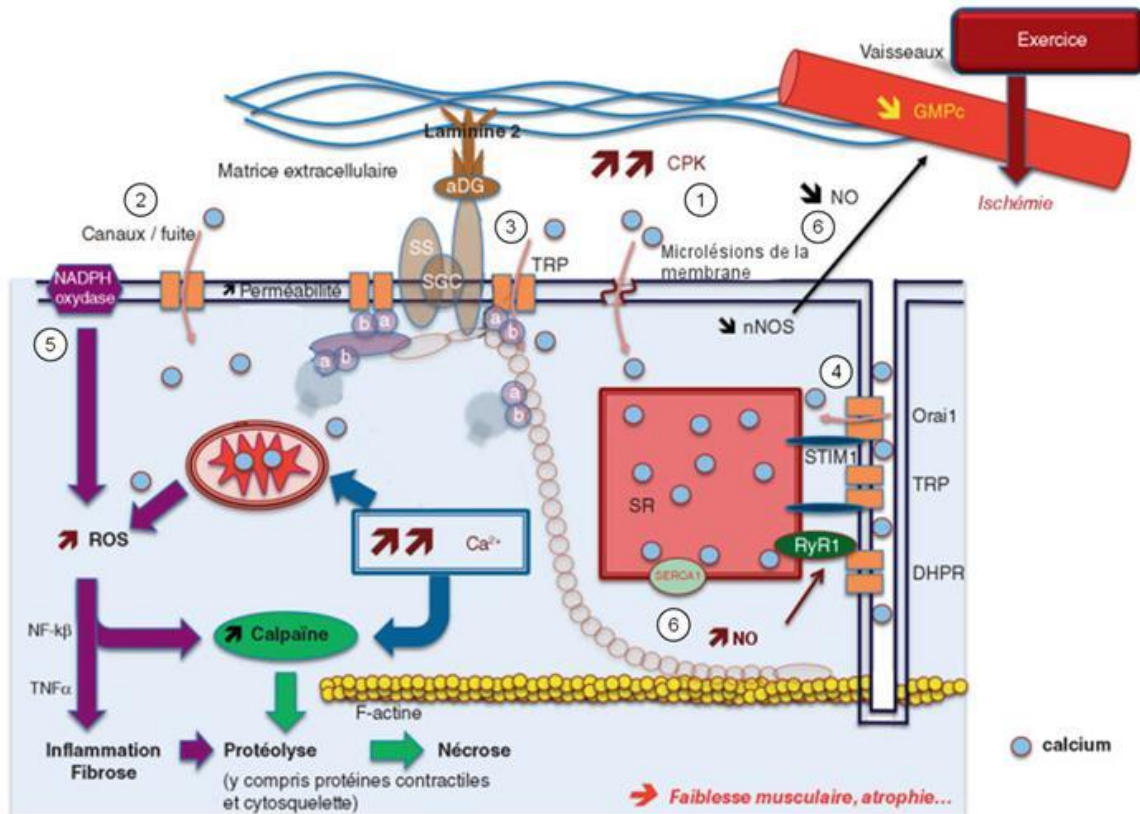


Figure 9 : Mécanismes physiopathologiques de la DMD. Plusieurs processus sont associés à la physiopathologie de DMD : microlésions de la membrane (1), dérégulation de l'homéostasie calcique due aux microlésions (1), aux fuites des canaux calciques (2), des canaux mécanosensibles TRP (3), et des canaux SOCE composé des protéines STIM1 et Orai1 (4), stress oxydatif (5) et perturbations de la nNOS (6). SS : Sarcospane, SGC : complexe des Sarcoglycanes, αDG : αDystroglycane, SR : réticulum sarcoplasmique (adaptée de Pereaon et al. Archives de Pédiatrie 2015).

1.3.5 Thérapies des dystrophinopathies

Il n'existe pas de thérapies permettant la guérison des dystrophinopathies. Cependant des stratégies sont mises en place pour améliorer la qualité de vie des patients et prolonger leur espérance de vie. Par exemple, afin de compenser la rétractation du tendon d'Achille ou la scoliose notamment, les patients peuvent porter des appareillages orthopédiques et effectuer de la kinésithérapie (Bushby et al. 2010). Les patients peuvent également bénéficier d'une assistance ventilatoire nocturne puis diurne, ce qui permet une prolongation de l'espérance de vie (Gomez-Merino et Bach, 2002).

Les patients sont également traités aux glucocorticoïdes. Ce traitement permet d'améliorer la force et la fonction musculaires ainsi que de retarder l'âge de la perte de la marche (Matthews et al. 2016). Ce traitement est en revanche accompagné d'effets secondaires, dont la prise de poids à court terme, une fragilité osseuse, de la cataracte ou un retard de croissance à long

terme (Schara *et al.* 2001).

La thérapie génique est une stratégie thérapeutique particulièrement étudiée dans le cadre de DMD. Le remplacement du gène entier de *DMD* n'est pas possible dans les connaissances actuelles car ce gène est trop grand pour être véhiculé dans les noyaux des cellules par les vecteurs viraux AAV (pour *Adeno-associated virus*, virus adéno-associés). Cependant, d'autres stratégies de thérapie génique utilisant ces vecteurs sont étudiées. Les vecteurs viraux sont des virus modifiés, qui ne sont pas pathogènes et non répliatifs. Les AAV permettent également une expression du gène d'intérêt dans le noyau sous forme d'épisome, donc sans intégration dans le génome, ce qui en fait des outils relativement sûrs. Ces vecteurs sont également utilisés pour leur faible immunogénicité et leur bonne pénétrance dans les fibres musculaires (Athanasopoulos *et al.* 2004).

- *Le saut d'exon thérapeutique*

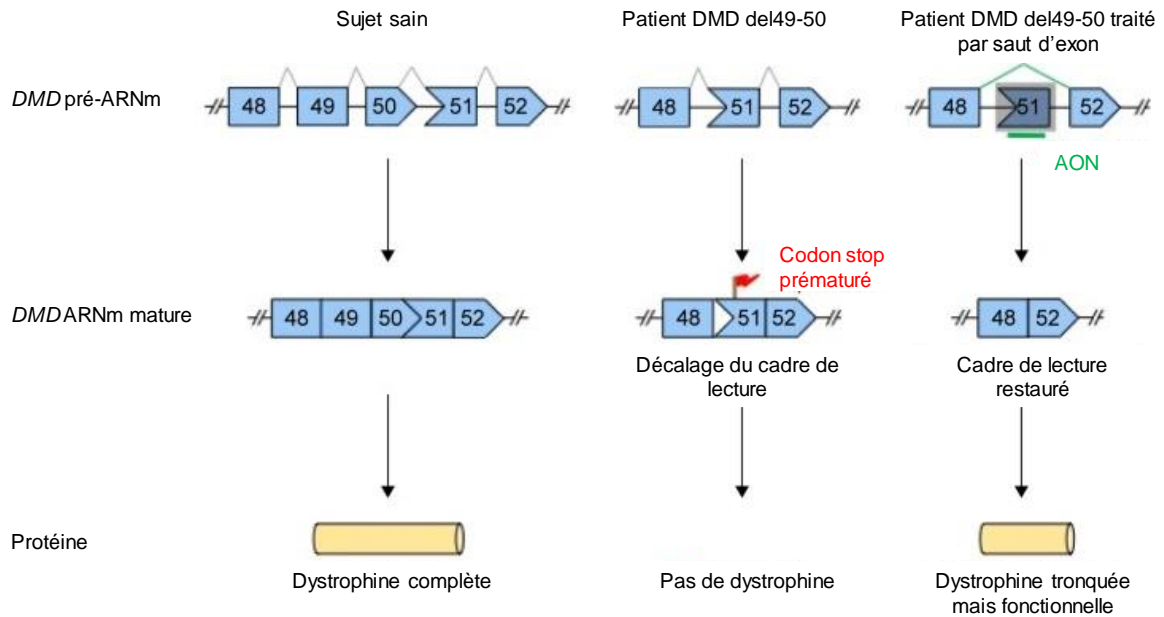
Le saut d'exon thérapeutique est une stratégie visant à rétablir le cadre de lecture du transcrit en utilisant la machinerie d'épissage de la cellule. L'épissage est le processus physiologique par lequel le pré-ARNm va être mûré en ARNm par l'excision des introns présents dans sa séquence. Ce mécanisme s'effectue grâce à des sites consensus, reconnus par la machinerie d'épissage. Dans le cadre du saut d'exon thérapeutique, les molécules utilisées vont s'hybrider et masquer les sites consensus d'épissage d'intérêt (Figure 10a). Cela va entraîner le saut du ou des exons concernés, qui sont alors excisés par la machinerie d'épissage comme le sont les introns. L'objectif est d'obtenir une protéine plus courte mais présente et en partie fonctionnelle, c'est-à-dire un phénotype BMD, décrit comme plus léger que le phénotype DMD. Les molécules utilisées pour le saut d'exon sont des oligonucléotides antisens (AON) modifiés chimiquement afin de ne pas être dégradés par les nucléases de la cellule (Figure 10b). Les premières molécules testées en essais cliniques ont été le drisapersen (BioMarin) et l'eteplirsén (Sarepta). Le drisapersen est un oligonucléotide 2'O-méthyl phosphorothioate (2'OMePS), c'est-à-dire avec des groupements méthyles remplaçant les groupements hydroxyyles en 2' des bases nucléotidiques et des groupements sulfure au niveau des groupements oxygène ne rentrant pas dans les liaisons (Aarstma-Rus *et al.* 2017). Le drisapersen est conçu pour permettre un saut de l'exon 51, stratégie qui touche le plus grand groupe de patients (13-14%) (Aarstma-Rus *et al.* 2017). L'eteplirsén permet également le saut de l'exon 51. Les oligonucléotides sont dans ce cas appelés PMO (pour phosphorodiamidate morpholino oligo). La modification consiste alors à remplacer le désoxyribose des bases par un cycle morpholine liés par des groupements phosphorodiamidate plutôt que les

groupements phosphate. Cette molécule a obtenu une autorisation provisoire de mise sur le marché, en attendant des résultats plus significatifs. D'autres molécules sont à l'étude dont les PMO conjugués avec un peptide (PPMO) qui permettraient une meilleure distribution des AON, notamment dans le cœur (Goyenvalle et Davies, 2011) ou encore les tricyclo-ADNs (tcADNs), oligonucléotides auxquels sont ajoutés 3 carbones entre le C5' et le C3' des bases et qui ont montré des résultats encourageants chez la souris *mdx*, le modèle murin de la DMD (Goyenvalle *et al.* 2015).

Ces molécules chimiques ont l'inconvénient de nécessiter des injections régulières du fait de leur instabilité, ce qui rend le traitement lourd et coûteux.

Une autre alternative est d'utiliser des vecteurs AAV. Une équipe a utilisé des AAV portant une séquence antisens permettant le saut d'exon, couplée à un petit ARN nucléaire U7. Celui-ci est normalement impliqué dans la maturation des histones, il n'est donc pas reconnu par la cellule comme une séquence exogène et va ainsi échapper à la dégradation par les nucléases, permettant une expression stable de la séquence antisens (Goyenvalle *et al.* 2004). Cette stratégie a pour objectif de n'effectuer qu'une seule injection pour avoir une restauration de la Dystrophine par saut d'exon efficace. Néanmoins, des travaux ont montré une perte des génomes viraux au cours du temps dans des muscles dystrophiques qui subissent des cycles de nécrose-régénération, associée à la perte du bénéfice thérapeutique amené par ces vecteurs (Le Hir *et al.* 2013). Cela représente une limite importante à l'utilisation de cet outil en clinique car il nécessite des doses importantes pour obtenir une restauration forte qui permette le maintien de l'effet thérapeutique.

a)



b)

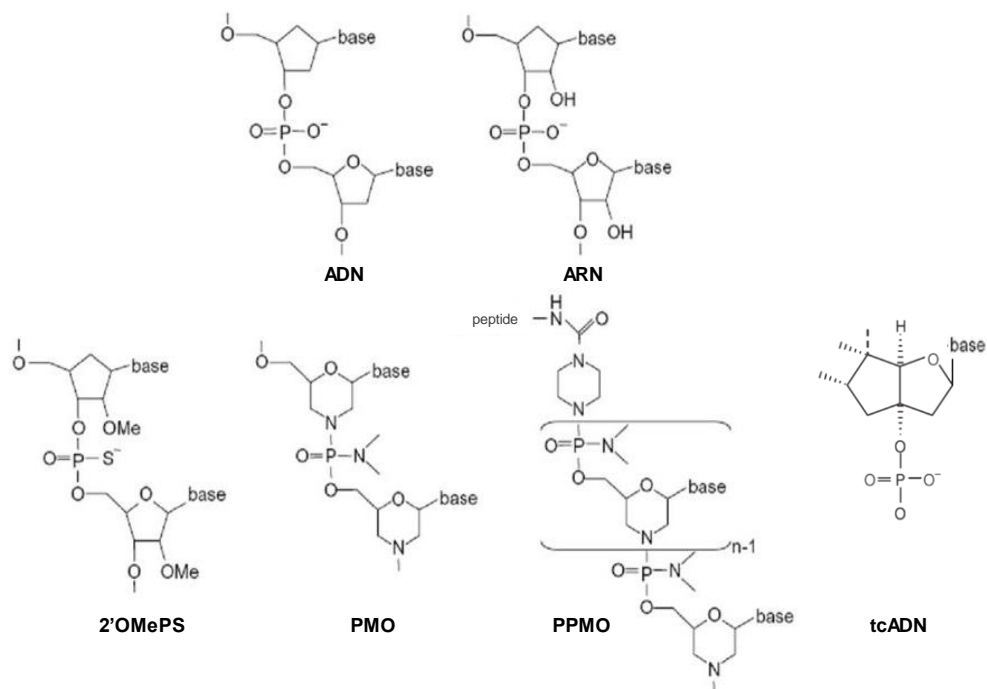


Figure 10 : Principe du saut d'exon thérapeutique (a) et structures chimiques des oligonucléotides antisens (b). a) La délétion 49-50 entraîne un décalage du cadre de lecture avec l'apparition d'un codon stop prématuré et finalement l'absence de Dystrophine. Les oligonucléotides antisens (AON) vont masquer les sites d'épissage de l'exon 51, entraînant une délétion de cet exon par un épissage qui se fera alors entre les exons 48 et 52, rétablissant le cadre de lecture et la présence d'une protéine tronquée mais fonctionnelle. b) Différentes structures chimiques existent pour les AON : 2'-O-méthyl phosphorothioate (2'OMePS), phosphorodiamidate morpholino oligo (PMO), PMO conjugué à un peptide (PPMO), tricyclo-ADN (tcADN) (adaptée de Lim et al. *Drug Design, Development and Therapy*, 2017).

- *Edition du gène par le système CRISPR/Cas9*

La délétion des exons pour rétablir le cadre de lecture peut être obtenue par le système CRISPR/Cas9. La modification se fera alors au niveau génomique. Ce système permet en effet d'amener au sein du génome, par l'intermédiaire d'un vecteur AAV, une nucléase Cas9, qui va cliver l'ADN double-brin à l'endroit précisément prévu par de petits ARN guides (ARNg), complémentaires de la séquence ciblée (Figure 11). L'ADN sera ensuite réparé par le mécanisme de réparation de l'ADN et notamment la jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ pour *Non-Homologous End-Joining*). Des preuves de concepts ont été effectuées dans la souris *mdx* (Nelson *et al.* 2016), dans des myoblastes DMD humains (Ousterout *et al.* 2015) et dans des cellules musculaires humaines issues de cellules pluripotentes induites (iPSC) dans le cadre d'une stratégie de thérapie cellulaire, dans laquelle les cellules restaurées seraient réinjectées au patient (Young *et al.* 2016). Les études actuelles portent sur l'optimisation de la séquence des ARN guides et la sécurité d'utilisation de ce système.

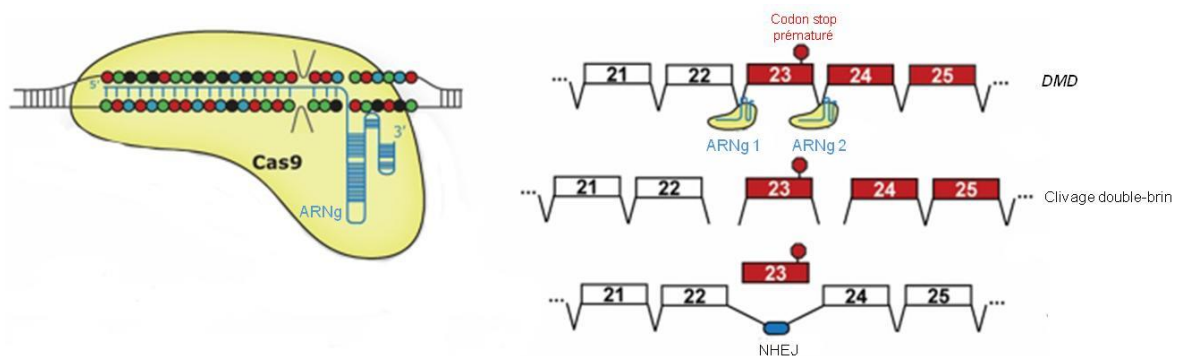


Figure 11 : Principe du système CRISPR/Cas9. Les ARN guides (ARNg) sont conçus de manière à permettre un clivage de l'ADN de part et d'autre de l'exon 23 ici, dont la mutation entraîne l'apparition d'un codon stop prématuré. L'exon sera ainsi délété, l'ADN réparé grâce au mécanisme de jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ) entraînant un rétablissement du cadre de lecture (*adaptée de Nelson et al. Science, 2015*).

- *La microdystrophine*

Le transfert d'une dystrophine plus courte, la microdystrophine, par thérapie génique est une autre stratégie utilisée dans le cadre de la DMD (Fabb *et al.* 2002). L'objectif est d'amener dans la cellule une version tronquée du gène *DMD* ce qui permettra d'avoir une protéine en partie fonctionnelle. Le transgène codant pour la microdystrophine est porté par des vecteurs AAV. Les séquences à conserver du gène *DMD* sont encore en cours d'optimisation mais on estime que le domaine de liaison à l'actine est essentiel ainsi que quatre régions de type spectrine et des régions charnières. La microdystrophine MD1, utilisée actuellement en pré-

clinique, possède par exemple le domaine N-terminal, les répétitions de type spectrine R1, R2, R3 et R24, les régions charnières H1, H2 et H4, la région riche en cystéine et une partie du domaine C-terminal (Foster *et al.* 2008) (Figure 12).

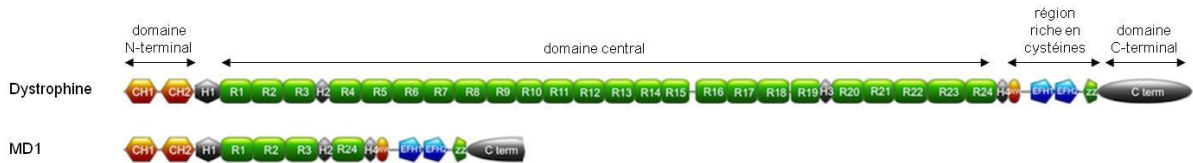


Figure 12 : Structures de la Dystrophine et de la microdystrophine MD1. La microdystrophine MD1 conserve les domaines d'homologie à la calponine (CH) ; un domaine central composé des répétitions de type spectrine 1, 2, 3 et 24 (R) et des régions charnières 1, 2 et 4 (H) ; une région riche en cystéines avec un domaine possédant 2 tryptophanes conservés (WW), 2 domaines de liaison au Ca^{2+} (EFH) et un domaine en doigt de zinc (ZZ) et une région C-terminale tronquée (*adaptée de e-dystrophin.genouest.org et de Foster et al, Molecular Therapy 2008*).

- *La suppression des codons stop prématurés*

Environ 10% des patients atteints de DMD ont une mutation non-sens, qui insère donc un codon stop prématuré (Reinig *et al.* 2017). Plusieurs molécules dont des antibiotiques de type aminoglycosides ou un agent pharmacologique appelé ataluren ont la capacité de se lier aux ribosomes et de permettre de remplacer le codon stop prématuré par un acide aminé alternatif, permettant alors la traduction de la Dystrophine. Des essais cliniques sont en cours mais les premières études donnent des résultats mitigés quant à l'effet de l'ataluren sur la force musculaire (Reinig *et al.* 2017).

- *Modulateurs des symptômes associés à la perte de la Dystrophine*

Plusieurs traitements annexes sont étudiés dans les dystrophinopathies, afin de moduler des symptômes liés à la perte de la Dystrophine, notamment des traitements régulant la nNOS, une protéine associée à la Dystrophine et liée à plusieurs mécanismes pathophysiologiques de la maladie (*cf.* II.5).

II. Nitrique Oxyde Synthase (NOS)

L'oxyde nitrique (NO) est une molécule impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires (*cf.* II.3). Elle est synthétisée par trois isoformes de l'enzyme NO synthase (NOS) codée par trois gènes différents : NOS de type neuronal (nNOS, codée par le gène *NOS1*), NOS inductible (iNOS, codée par le gène *NOS2*) et NOS endothéliale (eNOS codée par le gène *NOS3*).

La nNOS a d'abord été identifiée au niveau de neurones spécifiques dans le cerveau puis dans d'autres tissus dont les cellules épithéliales de plusieurs organes, dans les cellules de la macula dense des reins ou dans le muscle lisse vasculaire. Chez les mammifères, la plus grande source de nNOS en matière de masse tissulaire est retrouvée dans le muscle squelettique. Cette isoforme est codée par le gène *NOS1*, situé sur le chromosome 12 (Nathan et Xie, 1994).

La iNOS est une enzyme dont l'expression est induite en cas d'inflammation par l'activation des cytokines inflammatoires (Xie *et al.* 1992). Elle est codée par le gène *NOS2* situé sur le chromosome 17 (Nathan et Xie, 1994). Son induction dans les macrophages permet la production d'une grande quantité de NO, qui est la molécule cytotoxique majeure de ces cellules (*cf.* II.3).

La eNOS est principalement exprimée dans les cellules endothéliales mais on la trouve également dans les myocytes cardiaques, certains neurones ou encore dans le placenta. Elle est codée par le gène *NOS3* qui se trouve sur le chromosome 7 (Nathan et Xie, 1994, Förstermann et Sessa, 2011).

II.1 Transcrits et isoformes de nNOS

NOS1 est un gène présentant une grande complexité transcriptionnelle. En effet, jusqu'à douze exons 1 distincts ont été décrits (Wang *et al.* 1999 ; Freudenberg *et al.* 2015). Ils sont exprimés différemment selon les tissus et selon des promoteurs particuliers (Wang *et al.* 1999) (Figure 13a). Les divers transcrits sont également produits selon des épissages alternatifs différents. Ainsi on distingue des transcrits qui donneront quatre isoformes majeures de nNOS.

L'isoforme nNOS α (Figure 13b) a une taille de 160 kDa et est produite selon des transcrits différents de l'exon 1 en fonction des tissus, avec un exon alternatif entre l'exon 1 et 2 (AS). Le codon d'initiation se trouve au niveau de l'exon 2, exon codant le domaine PDZ qui

permet la liaison avec les protéines partenaires (dont la Dystrophine) mais également le recrutement de nNOS au noyau (Aquilano *et al.* 2014 ; Baldelli *et al.* 2014). Cette isoforme est aussi retrouvée dans le muscle au niveau des mitochondries sous une forme présentant des modifications post-traductionnelles (phosphorylation et acylation) (Elfering *et al.* 2002). Cette isoforme mitochondriale est appelée mtNOS.

L'isoforme nNOS β a une taille de 136 kDa et est produite par un transcrit qui n'a pas l'exon 2. Le domaine PDZ est donc absent dans cette isoforme (Brenman *et al.* 1997) (Figure 13c). Elle est présente dans le muscle squelettique au niveau de l'appareil de Golgi où elle a une action sur l'appareil contractile (*cf.* II.3) (Baldelli *et al.* 2014) et a également été décrite au niveau du sarcolemme de muscles de souris (Baum *et al.* 2011).

L'isoforme nNOS γ a une taille de 125 kDa. Son transcrit n'a pas les exons 1 à 3 et son codon d'initiation est dans l'exon 5 (Figure 13d). Cette isoforme est retrouvée majoritairement dans les testicules.

L'isoforme nNOS μ a une taille de 165 kDa. Elle est codée par un transcrit de même structure que le transcrit α avec l'insertion d'un exon μ de 102 pb entre les exons 16 et 17 (Figure 13e). Cet exon donne une insertion de 34 acides aminés. nNOS μ est l'isoforme majoritaire du muscle squelettique. Elle est liée à la Dystrophine au niveau de ses répétitions de type spectrine 16 et 17 (codée par les exons 42 à 46 du gène *DMD*) par l'intermédiaire de son domaine PDZ (Molza *et al.* 2015) et est donc retrouvée principalement au niveau du sarcolemme.

Toutes les isoformes de nNOS présentent un domaine oxygénase, un domaine de liaison à la calmoduline (CaM) et un domaine réductase (*cf.* II.2). L'isoforme γ n'a en revanche pas d'activité catalytique (Percival *et al.* 2010).

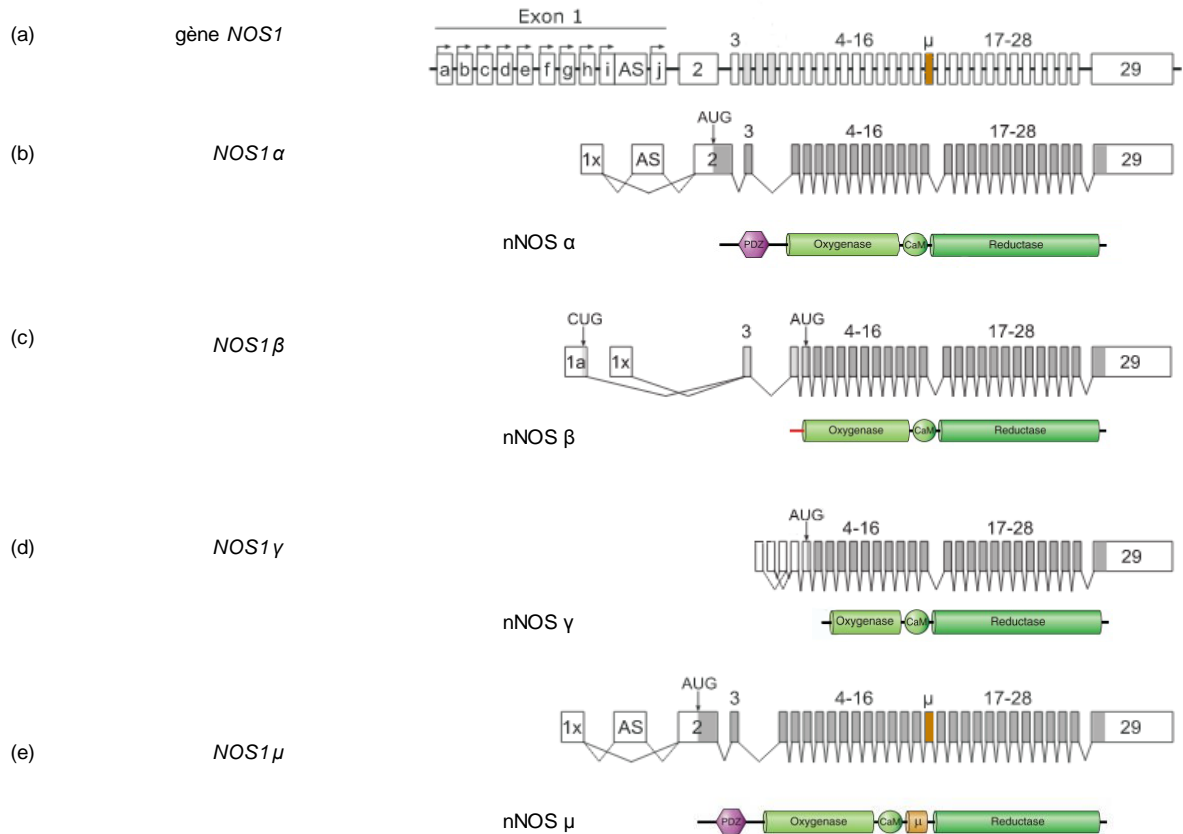


Figure 13 : Structure des différents transcrits et isoformes de nNOS. (a) Le gène *NOS1* possède 29 exons (rectangles blancs) plus un exon μ (rectangle orange). Il est décrit jusqu'à 12 exons 1 différents qui possèdent des promoteurs distincts (flèches). *NOS1* donne 4 transcrits différents : (b) *NOS1 α* (c) *NOS1 β* (d) *NOS1 γ* et (e) *NOS1 μ* . Les séquences traduites sont indiquées en gris (adaptée de Freudenberg et al. *Genes, Brain and Behavior* 2015 et Allen et al. *Physiological Reviews*, 2016).

II.2 Mécanismes de synthèse de l'oxyde nitrique (NO)

Les protéines NOS utilisent la L-arginine comme substrat et l'oxygène et le NADPH (forme réduite du Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) comme cosubstrats pour produire du NO. Les cofacteurs de cette réaction sont le FAD (Flavine Adénine Dinucléotide), le FMN (Flavine Mononucléotide) et le BH₄ (5,6,7,8-tétrahydro-L-bioptérine).

Toutes les isoformes de NOS sont des homodimères. L'association des deux monomères est possible grâce à la liaison d'un groupement hème. Les électrons vont transiter à partir de la NADPH, via la FAD et la FMN dans les domaines réductases puis dans l'hème dans le domaine oxygénase. Au niveau de l'hème, les électrons sont utilisés pour réduire et activer l'O₂ et pour oxyder la L-arginine en L-citrulline et NO en deux étapes (Förstermann et Sessa, 2012) (Figure 14). NOS va hydroxyler la L-arginine en N^ω-hydroxy-L-arginine, puis oxyder

la N^0 -hydroxy-L-arginine en L-citrulline et NO selon les réactions d'oxydoréduction suivantes :

- $2 \text{ L-arginine} + 2 \text{ NADPH} + 2 \text{ H}^+ + 2 \text{ O}_2 \Leftrightarrow 2 \text{ N}^0\text{-hydroxy-L-arginine} + 2 \text{ NADP}^+ + 2 \text{ H}_2\text{O}$
- $2 \text{ N}^0\text{-hydroxy-L-arginine} + \text{ NADPH} + \text{ H}^+ + 2 \text{ O}_2 \Leftrightarrow 2 \text{ L-citrulline} + 2 \text{ NO} + \text{ NADP}^+ + 2 \text{ H}_2\text{O}$

Les NOS possèdent également une liaison avec la calmoduline. Dans la nNOS et la eNOS l'affinité à la calmoduline est corrélée avec la concentration intracellulaire en Ca^{2+} . Lorsque cette affinité augmente, le flux d'électrons est facilité entre le NADPH et le groupement hème. L'activité enzymatique de nNOS est donc régulée par la calmoduline et le Ca^{2+} . Dans la iNOS, la calmoduline se lie à des concentrations faibles de Ca^{2+} intracellulaire, du fait d'une structure différente du site de liaison à la calmoduline (Förstermann et Sessa, 2012). Par ailleurs les NOS possèdent également un domaine qui lie le Zinc. Cette liaison permet une structure dimérique résistante mais n'a pas d'action catalytique (Hemmens *et al.* 2000).

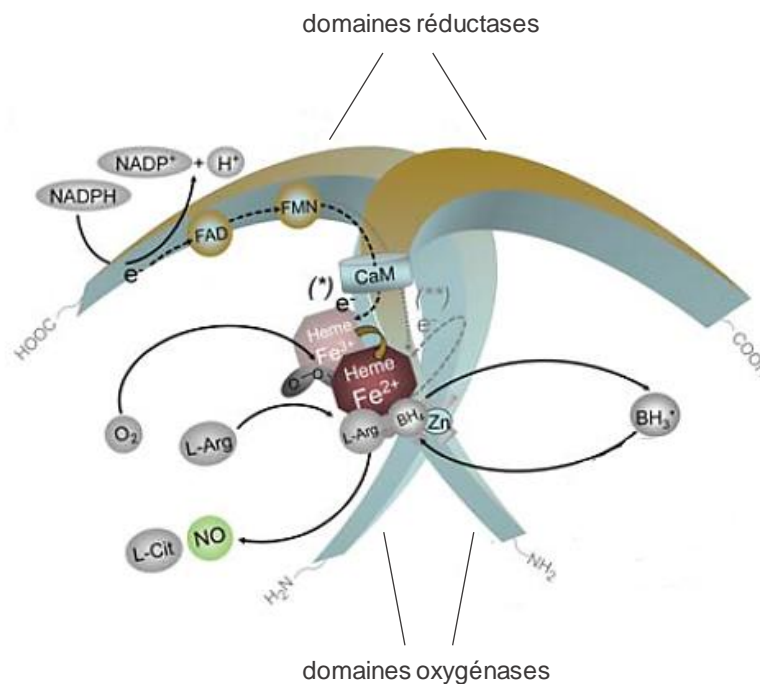


Figure 14 : Structure et mécanismes catalytiques de l'oxyde nitrique synthase. Les électrons vont transiter à partir de la NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduite), via la FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) et la FMN (Flavine Mononucléotide) dans les domaines réductases puis dans l'hème dans le domaine oxygénase. Le flux d'électrons est facilité par la calmoduline (CaM). Au niveau de l'hème, les électrons sont utilisés pour réduire et activer l' O_2 et pour oxyder la L-arginine (L-Arg) en L-citrulline (L-cit) et NO. BH_4 (5,6,7,8-tétrahydro-L-bioptérine) est un cofacteur qui peut donner un autre électron au Fer devenant ainsi le radical BH_3 . L-Arg : L-arginine, L-Cit : L-citrulline (adaptée de Förstermann et Sessa, *European Heart Journal*, 2011).

II.3 Fonctions de l'oxyde nitrique (NO) dans le muscle squelettique

Le NO est une molécule de signalisation dont les réponses sont médiées par l'interaction avec des groupements thiols et/ ou les complexes métalliques dans les protéines (Stamler et Meissner, 2001). En effet, le NO agit principalement par S-nitrosylation des cystéines situées dans les centres d'oxydo-réduction ou par des interactions avec le Fer ou le Cuivre. Une partie des réponses cellulaires dues au NO est liée à l'activation de la guanylate cyclase qui va permettre la conversion du guanosine 5'-triphosphate (GTP) en guanosine 3',5'-monophosphate cyclique (GMPc). Le GMPc va activer des protéines kinases impliquées dans de nombreuses cascades de signalisation cellulaire (Denninger et Marleta, 1999).

- *Vasodilatation*

nNOS μ , présente au niveau du sarcolemme par l'intermédiaire de son interaction avec le DAPC, a une action sur la régulation du flux sanguin (Figure 15a). En effet le NO produit va permettre une inhibition de la contraction α -adrénergique des vaisseaux pendant l'effort par l'intermédiaire des voies de signalisation du GMPc (Thomas *et al.* 1998).

- *Régulation transcriptionnelle*

NO entraîne des modifications post-traductionnelles de certaines protéines et en particulier la S-nitrosylation de facteurs de transcription tel que CREB (*cf.* ci-après Biogenèse des mitochondries) (Figure 15b) ou de régulateurs de l'expression génique telles que les histones déacétylases (HDAC) (Sha et Marshall, 2012 ; Cachiarelli *et al.* 2010). Ces fonctions sont altérées en absence de Dystrophine, et plusieurs mécanismes pathophysiologiques mettant en cause la nNOS sont décrits dans la DMD et la BMD (*cf.* II.4).

- *Contraction musculaire et fatigabilité*

Dans le muscle squelettique, le NO a un effet modulateur sur le couplage excitation-contraction en agissant sur le récepteur à la ryanodine, modulant la probabilité d'ouverture de ce canal calcique (Stamler et Meissner, 2001). C'est la forme β , au niveau de l'appareil de Golgi qui agit sur la contraction (Baldelli *et al.* 2014) (Figure 15c).

Il a également été montré que l'activité de nNOS était augmentée pendant l'exercice (Percival *et al.* 2010) et que des souris n'exprimant pas de nNOS et notamment l'isoforme β , présentaient une fatigue excessive à l'exercice (Percival *et al.* 2010).

- *Respiration mitochondriale*

Dans le muscle squelettique, le NO a également un effet inhibiteur de la respiration mitochondriale, en interférant directement avec le transport des électrons au sein de la chaîne mitochondriale (Baldelli *et al.* 2014) (Figure 15d). Différents processus sont impliqués : (i) le NO inhibe l'activité du cytochrome c en entrant en compétition avec l'O₂, (ii) le NO inhibe le transfert d'électron entre les cytochromes b et c du complexe III de la chaîne mitochondriale, augmentant la production mitochondriale de O₂⁻ et (iii) le NO inhibe le transfert d'électron et la fonction du NADH-déhydrogénase au niveau du complexe I de la chaîne mitochondriale (Baldelli *et al.* 2014).

- *Biogenèse des mitochondries*

Dans les myocytes en différenciation, nNOS_μ va permettre la S-nitrosylation de protéines nucléaires dont la protéine CREB qui va entraîner une activation du promoteur de PGC-1α. L'induction de PGC-1α va permettre l'expression de gènes mitochondriaux et l'augmentation de la masse mitochondriale (Aquilano *et al.* 2014) (Figure 15e).

- *Apport en glucose*

L'exercice musculaire et l'insuline vont phosphoryler nNOS_μ par les voies AMPKα et Akt respectivement. Cette phosphorylation va entraîner une augmentation de la production de NO et la translocation du transporteur de glucose GLUT4 de sa localisation intracellulaire vers la membrane plasmique et donc permettre l'assimilation du glucose (Kellogg *et al.* 2017) (Figure 15f).

- *Croissance musculaire*

Le NO peut également avoir une action sur la croissance du muscle, notamment par son action sur les précurseurs myogéniques que sont les cellules satellites. En effet, par l'intermédiaire de la voie de signalisation GMPc, le NO va permettre la stimulation de la prolifération des cellules satellites (Buono *et al.* 2012). Le NO peut également augmenter l'expression de Vangl2, un gène impliqué dans la polarité et la division symétrique des cellules satellites, par l'intermédiaire de la voie Wnt non-canonique (Buono *et al.* 2012). Enfin, le NO peut également activer les métalloprotéinases matricielles (MMP) présentes dans la matrice extracellulaire du muscle, qui, par l'intermédiaire d'une cascade de signalisation c-met réguleront l'activation et la prolifération des cellules satellites (Tidball et Wehling-Henricks, 2014).

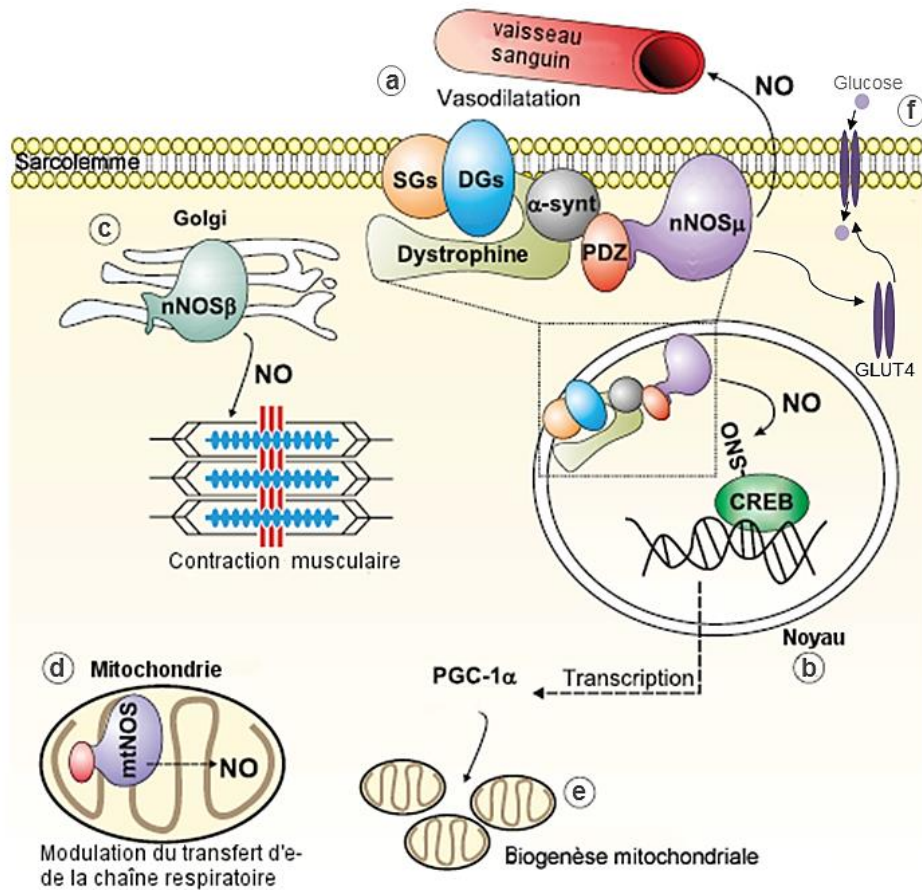


Figure 15 : Principales cibles du NO dans le muscle squelettique. (a) nNOS μ est localisée au sarcolemme par l'intermédiaire de son domaine PDZ qui lui permet de se lier au DAPC (α -synt : α -syntrophine DG : dystroglycane, SGs : sarcoglycane), le NO formé va permettre la dilatation des vaisseaux pendant l'effort. (b) le NO permet la régulation transcriptionnelle de certains gènes par S-nitrosylation (i.e CREB). (c) Au niveau du Golgi, la nNOS β a une action régulatrice sur le couplage excitation-contraction. (d) mtNOS module le transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire au niveau des mitochondries (e) la S-nitrosylation permet la transcription de gènes participant à la biogenèse des mitochondries. (f) une augmentation de production de NO pendant l'effort participe à l'apport en glucose par translocation à la membrane des transporteurs de Glucose (GLUT4) (adaptée de Baldelli et al. *Journal of Cell Science*, 2004).

II.4 Impacts de l'altération de la Dystrophine sur nNOS

L'altération de la Dystrophine dans la DMD et la BMD entraîne à la fois une perte de la localisation sarcolemmale de nNOS mais également une réduction de son expression (Brennan *et al.* 1995 ; Chang *et al.* 1996 ; Chao *et al.* 1996). Notre équipe a d'ailleurs montré une corrélation entre la localisation de nNOS μ et le phénotype des patients BMDdel45-55 puisque la nNOS μ est présente au sarcolemme dans les phénotypes modérés mais est strictement cytosolique dans les phénotypes sévères (Gentil *et al.* 2012). Dans cette étude les expressions transcriptionnelle et protéique de nNOS μ sont également diminuées dans les biopsies de patients BMDdel45-55 par rapport aux sujets sains. Il est également intéressant de

noter une diminution de l'expression de NO dans le sérum des patients DMD par rapport aux sujets sains (Güciyener *et al.* 2000).

En revanche, une augmentation de la iNOS dans les fibres musculaires en nécrose ou en régénération a été montrée chez les patients DMD et dans les souris *mdx* (Louboutin *et al.* 2001).

Les altérations de l'expression et de la localisation de nNOS ont un impact sur plusieurs mécanismes qui peuvent participer à la physiopathologie des dystrophinopathies.

II.4.1 Impacts sur le développement du muscle et sa croissance

Le NO peut initier les cascades de signalisation permettant la croissance du muscle et sa régénération, en activant les cellules satellites (Tidball et Wehling-Henricks, 2014) (cf. II.3 Croissance musculaire). La perte de l'expression de nNOS dans les muscles pour lesquels la Dystrophine est altérée et donc la perte de ces cascades de signalisation contribuent à la capacité réduite de régénération du muscle dystrophique (Buono *et al.* 2012).

La perte de nNOS peut aussi avoir un effet sur la structure de la chromatine (cf. II.3 Régulation transcriptionnelle). Les histones déacétylases (HDAC) sont des protéines qui vont inhiber la transcription des gènes en permettant la compaction de la chromatine par les histones. Cette inhibition est levée par la S-nitrosylation des HDACs. Dans les souris *mdx*, l'activité des histones est augmentée du fait de la perte de la localisation sarcolemmale de nNOS et donc de l'inhibition de la S-nitrosylation des HDACs (Colussi *et al.* 2008). Cette étude montre que des inhibiteurs d'HDACs ou le NO ont un effet bénéfique similaire sur la pathologie des souris *mdx*, effet qui serait dû à l'augmentation de la cascade de signalisation induite par la follistatine (régulée par HDAC) et qui entraînerait une augmentation de la croissance du muscle (Colussi *et al.* 2008).

II.4.2 Impacts sur la résistance du muscle à la fatigue

Des souris ne présentant pas d'expression de nNOS (nNOS-null) montrent une fatigabilité accrue après l'exercice et une diminution de l'activité, similaires à celles observées chez les souris *mdx* (Kobayashi *et al.* 2008 ; Percival *et al.* 2008). Ceci suggère que nNOS joue un rôle dans la fatigabilité des patients DMD et BMD.

Cette fatigabilité est due, d'une part, à des défauts dans la régulation du flux sanguin. En effet, des souris *mdx* ou nNOS-null montrent une incapacité à moduler les vasoconstrictions α -adrénergiques. Cela suggère que la diminution de l'expression de nNOS dans la DMD et la

BMD, empêche la dilatation des vaisseaux pendant l'exercice et participe ainsi aux mécanismes d'hypoxie et d'ischémie observés dans ces maladies.

D'autre part, il a été observé un défaut du métabolisme glycolytique chez les patients DMD et BMD (Rodriguez-Cruz *et al.* 2015), qui montrent une accumulation anormale des transporteurs du glucose GLUT4 dans le cytoplasme, accumulation qui pourrait être liée à un défaut de nNOS (Kellogg *et al.* 2017).

Enfin, l'augmentation de iNOS et la perte de la localisation sarcolemmale de nNOS dans la DMD et la BMD entraînent une hypernitrosylation des récepteurs à la ryanodine avec pour conséquence une sensibilisation de ces canaux et ainsi une fuite intracytoplasmique de Ca^{2+} (Bellinger *et al.* 2009 ; Gentil *et al.* 2012), ce qui participe à la fatigabilité du muscle après l'exercice. Il a été montré que la restauration de la dystrophine par saut d'exon chez les chiens GRMD (*Golden Retriever Muscular Dystrophy*, modèle canin de la DMD), était associée à la relocalisation de la nNOS μ au sarcolemme ainsi qu'à une normalisation de la nitrosylation des RyR, participant à une récupération de la force musculaire chez les chiens traités (Gentil *et al.* 2016).

II.5 Traitements par NO dans la DMD

Du fait de l'implication de NO dans la physiopathologie des dystrophinopathies, plusieurs études ont été réalisées pour évaluer l'effet d'un traitement par le NO ou par l'activation de nNOS. Différentes stratégies ont été mises en place.

II.5.1 Restauration de nNOS

Des souris *mdx* exprimant un transgène nNOS et donc ayant une production normalisée de NO montrent une amélioration des caractéristiques pathologiques des dystrophinopathies : une réduction de la centronucléation, signe de cycles de dégénération/régénération du muscle, une diminution de l'inflammation et des dommages membranaires des fibres musculaires avec notamment une baisse du taux de CK (Wehling *et al.* 2001 ; Nguyen et Tidball, 2003). Ces améliorations ne sont pas liées à une restauration du DAPC et donc pas à une relocalisation de nNOS (Tidball et Wehling-Henricks, 2004). En revanche, ces travaux ne présentent pas d'études fonctionnelles. Au vu de l'importance de la régulation de nombreux processus physiologiques par la nNOS μ sarcolemmale, une autre équipe a réalisé une lignée de souris transgéniques qui présentaient une nNOS modifiée par une palmylation, lui permettant de se lier au sarcolemme sans la présence du DAPC (Rebolledo *et al.* 2016). Ces

souris transgéniques présentent une augmentation de la production de NO. Les résultats des études fonctionnelles montrent une résistance de ces souris à la fatigue et aux lésions induites par des contractions excentriques ainsi qu'une prévention de la perte de la force. De façon intéressante, ces souris présentent également une augmentation de l'expression sarcolemmale de l'utrophine, une protéine proche de la Dystrophine, exprimée dans l'embryon, ainsi que des protéines du DAPC (Rebolledo *et al.* 2016).

Ces études montrent l'importance de nNOS dans la pathophysiologie de la DMD mais ces stratégies de transgènes n'étant pas réalisables chez l'homme, d'autres voies ont été évaluées.

II.5.2 Supplémentation en nitrate

Le nitrate de sodium est un composé inorganique donneur de NO. Une équipe a apporté une supplémentation en nitrate de sodium chez des patients BMD pour lesquels la mutation dans le gène *DMD* entraînait une perte de la nNOS sarcolemmale. Ce travail montre que la vasodilatation est améliorée chez ces patients dans le muscle en exercice (Nelson *et al.* 2015). En revanche, une étude sur des souris *mdx* montre qu'une supplémentation en nitrate augmente la production de peroxy-nitrite ce qui induit des dommages dans le muscle squelettique et n'améliore pas la respiration mitochondriale (Timpani *et al.* 2017).

II.5.3 Supplémentation en L-arginine

Une stratégie alternative pour compenser la perte de nNOS est d'apporter de la L-arginine, le substrat des NOS, afin d'augmenter la production de NO par les NOS présentes. Une étude montre que la supplémentation en L-arginine chez des souris entraîne une augmentation de l'utrophine, une protection contre les lésions dues aux contractions mais n'apporte pas d'augmentation de la force (Barton *et al.* 2005). D'autres équipes montrent que la L-arginine en association avec des corticoïdes chez des souris entraîne une diminution des lésions ainsi que de la fatigabilité (Archer *et al.* 2006 ; Guerron *et al.* 2010), une diminution de la nécrose avec une baisse de l'inflammation et une amélioration de la régénération (Hnia *et al.* 2008).

L'arginine semblant mener à des bénéfices dans les modèles de DMD, un essai clinique a été mené sur des patients DMD. Ces patients ont reçu une combinaison de L-citrulline (un précurseur de L-arginine) et de la metformine, qui stimule la voie AMPK qui va elle-même activer nNOS ainsi que PGC-1 α ce qui va améliorer les fonctions mitochondriales (Hafner *et al.* 2016). Il a été en effet observé dans l'étude pilote effectuée sur cinq patients une

amélioration de la respiration mitochondriale, une diminution du stress oxydatif et une amélioration des fonctions motrices et de la marche chez quatre patients sur cinq (Hafner *et al.* 2016). L'essai clinique réalisé avec 45 patients (22 patients traités et 23 patients recevant un placebo) montre des résultats encourageants avec un retard du déclin moteur et une réduction de la dégénération des muscles chez les patients traités (Fisher *et al.* Présentation orale World Muscle Society 2017).

II.5.4 Inhibition de l'activité phosphodiesterase

Le NO active des cascades de signalisation cellulaire par l'intermédiaire du GMPc (*cf.* II.3). La production de NO étant réduite dans le muscle dystrophique, une pharmacologie permettant d'amplifier le signal de la GMPc est une stratégie de thérapie utilisée. Dans ce cadre, les phosphodiesterases qui hydrolysent le GMPc, ont été ciblées par des inhibiteurs dans plusieurs études (Asai *et al.* 2007 ; De Arcangelis *et al.* 2016 ; Nelson *et al.* 2014 ; Martin *et al.* 2012). Les résultats des études pré-cliniques menées sur des souris *mdx* étaient prometteurs puisqu'on observait une amélioration de l'ischémie, une diminution des dommages induits par la contraction, une amélioration de l'histologie et des performances à l'exercice (Asai *et al.* 2007 ; De Arcangelis *et al.* 2016). Des essais cliniques sur de petits groupes de patients DMD (Nelson *et al.* 2014) et BMD (Martin *et al.* 2012) ont montré une amélioration de l'ischémie par la restauration de la régulation du flux sanguin.

En revanche les essais cliniques de phase 3 menés sur des patients DMD et BMD ont été stoppés par manque d'efficacité (Leung *et al.* 2014 ; Witting *et al.* 2014).

III. Les ARNs non-codants

III.1 Les micro-ARNs

Les micro-ARNs (miARNs) représentent un ensemble conservé de petits ARNs non-codants d'environ 22 nucléotides. Ils sont impliqués dans la régulation de l'expression de leur(s) gène(s) cible(s) au niveau post-transcriptionnel principalement, soit en permettant la dégradation de l'ARNm soit en inhibant la traduction de la protéine codée par ce gène.

III.1.1 Biogenèse des miARNs

Les gènes codant les miARNs se trouvent soit dans des introns de gènes, ils partagent alors les éléments régulateurs et le transcrit primaire avec leur gène hôte, soit au niveau de clusters intergéniques ou dans des unités de transcription individuelles, ils sont alors transcrits à partir de leur propre promoteur.

Les miARNs sont transcrits par la polymérase II en un précurseur appelé pri-miARN qui comprend une coiffe en 5' et une queue polyadénylée (poly(A)) (Lee *et al.* 2004) (Figure 16.1). Le pri-miARN est transformé dans le noyau par le microprocesseur, un complexe constitué d'une endonucléase RNase III, Drosha liée à une protéine de liaison à l'ARN double-brin, DGCR8 (Han *et al.* 2004) (Figure 16.2). Le clivage du pri-miARN par le microprocesseur donnera un pré-miARN d'une taille d'environ 70 nucléotides et d'une structure imparfaite en épingle à cheveux.

Le pré-miARN ainsi formé est transporté dans le cytoplasme par l'exportine 5 et un complexe Ran-GTP, une petite protéine de la famille des RAS, liant le GTP et qui est nécessaire à la translocation de l'ARN et des protéines à travers le pore nucléaire (Yi *et al.* 2003) (Figure 16.3).

Le clivage nucléaire par Drosha définit donc une extrémité du miARN mature. L'autre extrémité est transformée dans le cytoplasme par une endonucléase RNase III appelée Dicer en association avec son cofacteur liant l'ARN (Tbrp) (Ketting *et al.* 2001), donnant ainsi un miARN double-brin (Figure 16.4). Un seul brin de ce miARN mature sera intégré dans le complexe RISC (RNA-induced Silencing Complex) (Figure 16.5). RISC est un complexe ribonucléoprotéique formé du miARN et de protéines de la famille des Argonautes (Ago). Ces protéines ont une activité endonucléase directe contre l'ARNm complémentaire de leur miARN intégré, mais elles agissent aussi sur la sélection du brin intégré du miARN, appelé brin guide (miR). La protéine Ago va en effet sélectionner le brin guide dont la stabilité est la

plus faible au niveau de l'extrémité 5'. L'autre brin (le brin passager, miR*) sera dégradé par le complexe RISC (Schwarz *et al.* 2003). Ago va également se lier avec la protéine GW182 (aussi appelée TNRC6 chez les mammifères), qui va faciliter la dégradation de l'ARNm par les miARNs (Pfeiff et Meister, 2013).

Des voies non-canoniques de biogenèse des miARNs ont été décrites (Ha et Kim, 2014). La voie des mirtrons s'affranchit de la protéine Drosha, utilisant alors la machinerie d'épissage des ARNm. En effet, l'intron épissé va être processé pour avoir une structure similaire au pré-miARN et être ainsi pris en charge par Dicer puis par le complexe RISC (Ruby *et al.* 2007). Une autre voie non-canonique s'affranchit de Dicer, c'est alors la protéine Ago qui clivera le pré-miARN (Ha et Kim, 2014).

Après son intégration dans le complexe RISC, le miARN exercera ses effets régulateurs en se liant au niveau de ses sites complémentaires sur l'ARNm.

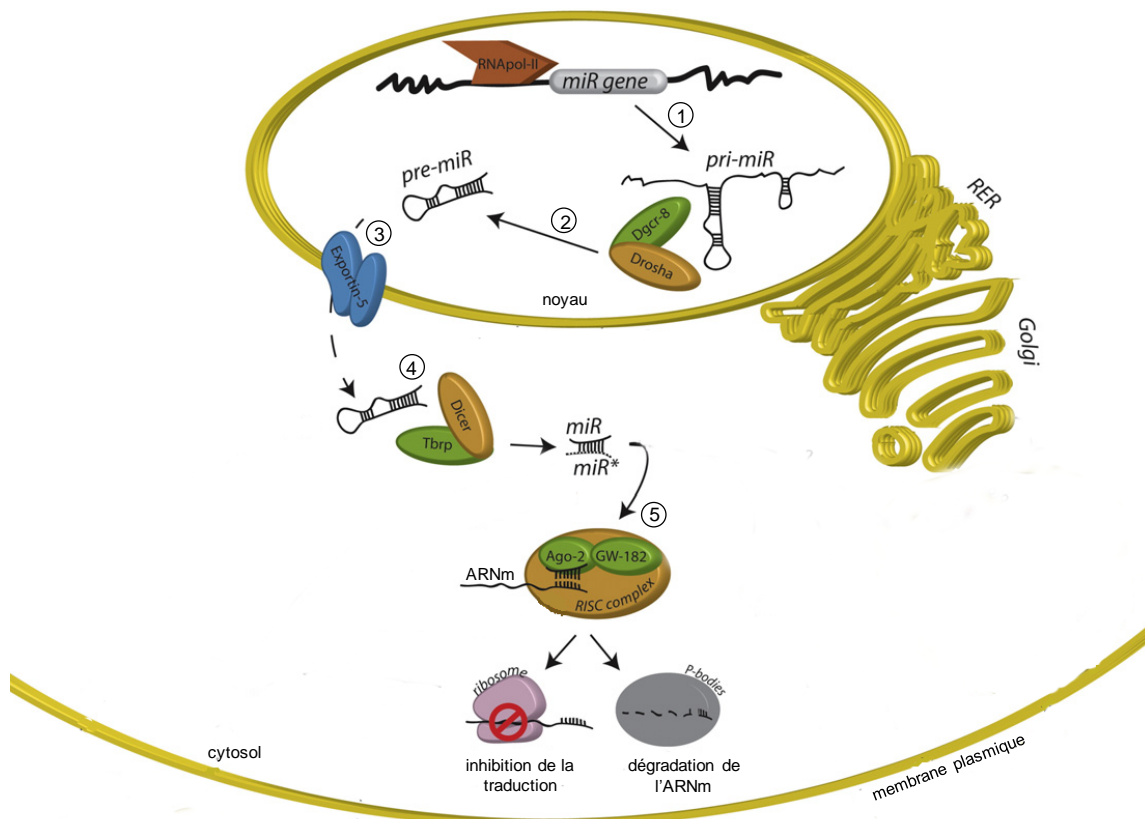


Figure 16 : Voie canonique de la biogenèse des microARNs. Dans le noyau, le gène miARN (miR gène) est transcrit en pri-miR (1) puis processé en pré-miR par le complexe Droscha/DGCR8 (2). Le pré-miR est ensuite transporté dans le cytosol par l'exportine 5 (3) où il va être processé par Dicer/Trbp en miARN (4). Le complexe RISC assure ensuite la répression de l'expression de la cible (5), soit pas inhibition de la traduction soit par dégradation de l'ARNm dans les P-bodies (*Processus bodies*) (cf. III.1.3) (adaptée de Quattrocelli and Sampaolesi, 2015).

III.1.2 Appariement miARN-ARNm

Les miARNs interagissent avec leur ARNm cible par appariement de bases, principalement au niveau des extrémités 3'UTR (*Untranslated Transcribed Region*, région transcrite non-traduite) des gènes, mais aussi aux extrémités 5'UTR et dans les régions codantes (Brodersen et Voinnet, 2009).

L'interaction du miARN au niveau de l'extrémité 3'UTR de l'ARNm répond à plusieurs règles (Figure 17) :

- La fixation du miARN avec l'ARNm se fait préférentiellement dans la région dite « d'amorçage » (*seed region*), située entre les nucléotides 2 à 8 à partir de l'extrémité 5' du miARN (en rouge) (Doench et Sharp, 2004 ; Brennecke *et al.* 2005). La plupart des sites d'amorçage sont préférentiellement conservés. Des appariements G/U, des mésappariements ou des boucles au niveau de la région d'amorçage, entraînent une diminution de la répression par le miARN (Lewis *et al.* 2005). En revanche, une adénine sur l'ARNm en face de la position 1 du miARN ou une adénine ou un uracile en face de la position 9 (en jaune) améliorent l'efficacité de la répression (Nielsen *et al.* 2007).
- Il doit y avoir une boucle ou un mésappariement dans la région centrale du duplex miARN-ARNm, condition nécessaire à un clivage endonucléolytique de l'ARNm par Argonaute.
- La seule région d'amorçage n'est pas suffisante pour assurer la stabilité de l'interaction. Ainsi, il doit également y avoir une complémentarité suffisante de l'ARNm avec la moitié 3' du miARN et notamment au niveau des résidus 13 à 16 (en bleu), en particulier lorsque l'appariement de la région d'amorçage n'est pas optimal (Brennecke *et al.* 2005).

D'autres facteurs peuvent améliorer l'efficacité : des régions voisines du site d'interaction riches en A/U, une position proche de la queue poly(A) ou du codon stop pour les longs 3'UTR permettant une région moins structurée et donc plus accessible au complexe de reconnaissance du miARN (Grimson *et al.* 2007 ; Nielsen *et al.* 2007).

Les sites de liaison du miARN sur l'ARNm sont généralement présents en plusieurs copies et ces copies multiples sont requises pour obtenir une répression efficace. De plus, quand ces copies sont proches les unes des autres, elles ont tendance à agir en coopération, entraînant un effet répressif plus important que des sites pris indépendamment (Grimson *et al.* 2007).

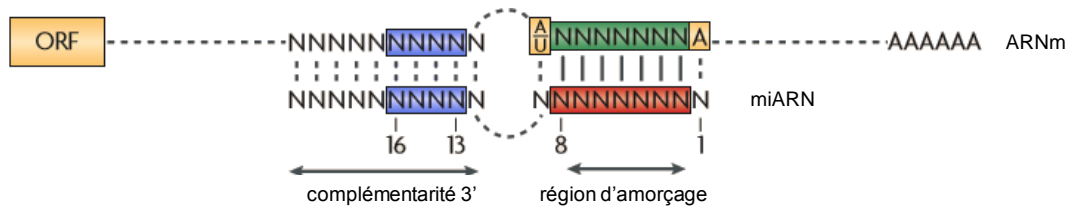


Figure 17 : Appariement miARN-ARNm. La fixation du miARN avec l'ARNm se fait dans la région d'amorçage située entre les nucléotides 2 à 8 à partir de l'extrémité 5' du miARN (en rouge). Une adénine sur l'ARNm en face de la position 1 du miARN ou une adénine ou un uracile en face de la position 9 (en jaune) améliorent l'efficacité de la répression. Il est nécessaire d'avoir une boucle ou un mésappariement au centre (*Bulge*). Il doit y avoir une complémentarité suffisante de l'ARNm avec la moitié 3' du miARN et notamment au niveau des résidus 13 à 16 (en bleu) (*adaptée de Filipowicz et al. Nature Reviews Genetics, 2008*).

III.1.3 Mécanismes de répression

Les miARNs régulent l'expression de leur gène cible par deux mécanismes post-transcriptionnels, principalement, définis selon la complémentarité de leur séquence d'amorçage avec celle du gène cible. En effet, une fois incorporé dans le complexe RISC, le miARN entraînera un clivage de l'ARNm cible si la séquence est parfaitement complémentaire ou inhibera la traduction de l'ARNm en protéine si la complémentarité n'est pas suffisante pour le clivage.

- *Clivage de l'ARNm*

La protéine Ago au sein du complexe RISC possède une activité endonucléolytique qui va lui permettre de cliver l'ARNm cible lorsque la complémentarité entre le miARN et sa cible est parfaite (Hutvagner and Zamore, 2002 ; Meister et Tuschl, 2004). Le site prédominant de clivage de l'ARNm est situé au niveau du dixième nucléotide à partir de l'extrémité 5' de la région couverte par le miARN (Elbashir *et al.* 2001). Cependant, chez les mammifères le clivage de l'ARNm par le miARN est un événement très rare car la complémentarité du miARN et de son ARNm cible est dans la plupart des cas imparfaite. On a alors une inhibition de la traduction plutôt qu'un clivage de l'ARNm (Bartel, 2004).

- *Inhibition de la traduction*

Étapes de la traduction

La traduction de l'ARNm se déroule en trois grandes étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. L'ARNm possède une coiffe 7-méthyl-guanosine à son extrémité 5' et une queue poly(A) à l'extrémité 3' qui permettent d'une part la stabilité de l'ARNm en le protégeant de l'action d'exonucléases et d'autre part contribuent à la traduction de l'ARNm (Derry *et al.*

2006 ; Varani *et al.* 1997). La coiffe est reconnue par le facteur d'initiation de la traduction eIF4E (*eucaryotic Initiation Factor 4E*) qui va recruter d'autres facteurs de traduction dont eIF4G, l'hélicase eIF4A et eIF3 (Gingras *et al.* 1999) (Figure 18). L'interaction d'eIF4G avec eIF3 va faciliter le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome (Kapp et Lorsch, 2004) qui va commencer à scanner l'ARNm pour trouver le codon d'initiation. eIF4G va également interagir avec la protéine PABP (*polyadenylate-binding protein*), qui se lie au niveau de la queue polyadénylée à l'extrémité 3' de l'ARNm. Ainsi, eIF4G, de par son interaction avec eIF4E et avec PABP va permettre un rapprochement des deux extrémités de l'ARNm. Cette « circularisation » de l'ARNm stimule l'initiation de la traduction en augmentant l'affinité d'eIF4E avec la coiffe (Wells *et al.* 1998). La protéine eIF4A est nécessaire pour le déroulement de la structure au niveau de l'extrémité 5' de l'ARNm (Lu *et al.* 2014).

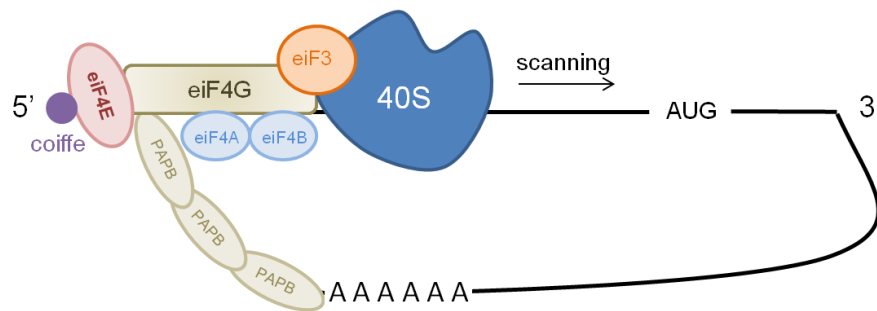


Figure 18 : Mécanisme d'initiation de la traduction. La coiffe en 5' est reconnue par le facteur d'initiation de la traduction eIF4E (Eucaryotic Initiation Factor 4E) qui va recruter eIF4G, l'hélicase eIF4A et eIF3. L'interaction de eIF4G avec eIF3 va faciliter le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome (qui va commencer à scanner l'ARNm pour trouver le codon d'initiation (AUG)). eIF4G va également interagir avec la protéine PABP (polyadenylate-binding protein), qui se lie au niveau de la queue polyadénylée à l'extrémité 3' de l'ARNm, permettant un rapprochement des deux extrémités de l'ARNm ce qui stimule l'initiation de la traduction en augmentant l'affinité de eIF4E avec la coiffe.

Au niveau du codon d'initiation la sous-unité 60S du ribosome va être recrutée et l'étape d'élongation du peptide va commencer. Au niveau du codon stop, le ribosome va recruter un facteur de libération (eRF, *eucaryotic Releasing Factor*) et libérer la protéine formée (Jackson *et al.* 2010).

Mécanismes de répression de la traduction

Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer la répression de la traduction par les miARNs :

- La fixation du miARN au niveau de l'ARNm peut entraîner une dégradation de l'ARNm qui peut être en elle-même un processus de répression de l'ARNm mais accompagne aussi

généralement l'inhibition de la traduction (Eulalio *et al.* 2009, Wu *et al.* 2006). Cette dégradation est due à la déadénylation de l'ARNm (Figure 19a). La déadénylation est due à deux principaux complexes (Stroynowska-Czerwinska *et al.* 2014) : le complexe PAN2-PAN3 qui va permettre la déadénylation initiale de façon rapide et le complexe CCR4-NOT qui est responsable du raccourcissement de la queue poly(A). La protéine GW182, liée à Ago au sein du complexe RISC, et la sous-unité PAN2, possèdent un motif protéique leur permettant de se lier à la protéine PABP1, GW182 va alors recruter PAN3, et la déadénylation va démarrer (Braun *et al.* 2011). Par ailleurs, CCR4-NOT va également se lier à GW182, permettant la phase finale de la déadénylation (Hafner *et al.* 2011 ; Braun *et al.* 2011).

La déadénylation se poursuit par la dégradation du transcrit, soit par le décoiffage, par l'intermédiaire du complexe DCP1-DCP2 suivi de la dégradation de l'ARNm par l'exonucléase de 5' vers 3' XRN1 soit par l'action d'exonucléases cytoplasmiques de 3' vers 5'. Les miARNs associés aux ARNm ainsi que les protéines de dégradation de l'ARNm sont retrouvés dans les P-bodies (*Processing bodies*), des structures dynamiques du cytoplasme qui sont des sites de stockage et de dégradation de l'ARNm (Jakymiw *et al.* 2007).

- La fixation du miARN sur l'ARNm peut entraîner un blocage de l'initiation de la traduction (Figure 19c). En effet, il est proposé que le complexe RISC empêche le recrutement des ribosomes en entrant en compétition avec les facteurs d'initiation au niveau de la coiffe (eIF4A : Meijer *et al.* 2013, Fukao *et al.* 2014, eIF4E : Chapat *et al.* 2017, eIF4G : Zekri *et al.* 2009, Chen et Gao, 2017). Il a également été proposé que le complexe RISC recrute un facteur eIF6 qui empêcherait la liaison entre les sous-unités 40S et 60S du ribosome (Chendrimada *et al.* 2007, Wang *et al.* 2008).

- La répression peut se faire par une terminaison prématurée de la synthèse du peptide et sa dégradation. Cette hypothèse est confortée par la présence de miARNs et d'éléments du complexe RISC associés aux ribosomes par l'intermédiaire de l'ARNm (Nottrot *et al.* 2006 ; Petersen *et al.* 2006, Maroney *et al.* 2006) et par l'observation que les miARNs peuvent inhiber la traduction indépendamment de la coiffe en 5', à travers les sites d'entrée internes des ribosomes (IRES, *Internal Ribosome Entry Site*) (Petersen *et al.* 2006). Plusieurs mécanismes sont proposés : le polypeptide en élongation serait dégradé (Nottrot *et al.* 2006) (Figure 19b) ou l'élongation serait inhibée par dissociation prématurée des ribosomes après l'association du miARN et du complexe RISC au niveau de l'ARNm (Petersen *et al.* 2006) (Figure 19d).

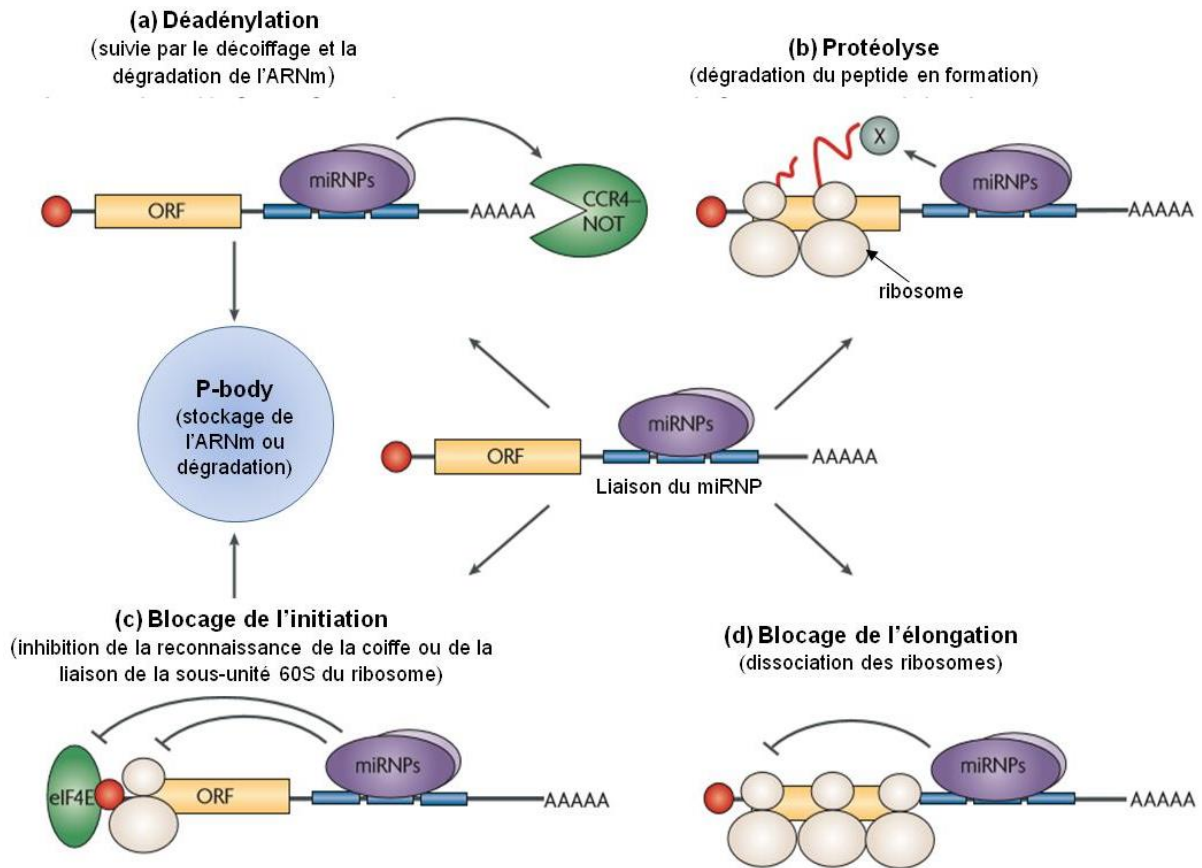


Figure 19 : Mécanismes possibles de répression post-transcriptionnelle par les miARNs. Plusieurs mécanismes sont proposés : la dégradation de l'ARNm après déadénylation (a), le blocage de l'élongation des peptides par dégradation du peptide en formation (b), le blocage de l'initiation de la traduction par inhibition de la reconnaissance de la coiffe ou de la liaison du ribosome (c) ou un blocage de l'élongation par la dissociation prématurée des ribosomes (d). miRNP : *microRNA ribonucleoprotein complex*, ORF : cadre de lecture ouvert (*Open Reading Frame*) (adaptée de Filipowicz et al. *Nature Reviews Genetics*, 2008).

III.1.4 Modulation transcriptionnelle

Les miARNs sont classiquement décrits comme agissant de façon post-transcriptionnelle sur leurs gènes cibles. Cependant, il a également été décrit une régulation dans le noyau, au niveau des promoteurs des gènes cibles. Ainsi, les miARNs peuvent induire la transcription de leur gène cible, en se fixant au niveau du promoteur de ce gène (Place et al. 2008). Il est proposé que le miARN empêche alors l'action d'un élément inhibant la transcription. Par ailleurs, il a également été montré que les miARNs pouvaient avoir une action répressive de la transcription, notamment en inhibant l'action de lncARN au niveau des promoteurs des gènes (Younger et Corey, 2011).

III.1.5 miARNs dans le muscle

- *miARNs spécifiques du muscle : les myomiRs*

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 : différenciation ou prolifération des myoblastes, régénération, remodelage de la chromatine... (Horak *et al.* 2016 ; Chen *et al.* 2006 et 2010 ; Cacchiarelli *et al.* 2010).

Les miR-1, -133a/b et -206 sont également appelés dystromiRs car leur expression est dérégulée dans les dystrophinopathies (Greco *et al.* 2009 ; Vignier *et al.* 2013 ; Cacchiarelli *et al.* 2010 et 2011 ; Hu *et al.* 2014) (*cf.* paragraphe suivant).

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.

- *miARNs : biomarqueurs de pathologies du muscle squelettique*

Plusieurs études montrent une expression différente du profil des miARNs en fonction de la maladie ou de la sévérité. Une équipe a ainsi montré une dérégulation de 185 miARNs dans des biopsies musculaires de patients atteints de dix pathologies différentes (DMD, BMD,

dystrophie musculaire fascioscapulohumérale, myopathie des ceintures de type 2A et 2B, myopathie de Miyoshi, myopathie à némaline, polymyosite, dermatomyosite, myosite à inclusions) (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. Ces données ont été confirmées par une autre équipe qui montre que 9 des 16 miARNs dérégulés dans les laminopathies (des pathologies musculaires due à des mutations dans le gène *LMNA* codant la lamine de type A) induisent la même dérégulation dans d'autres maladies du muscle ou du cœur (Sylvius *et al.* 2011). L'étude de Eisenberg *et al.* montre également qu'il existe un profil de miARNs particulier à chaque maladie, avec notamment 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, à savoir les miR-31, -34c, -206, -335, -449 et -494 (Greco *et al.* 2009). Ces travaux 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. Il est à noter que dans ce travail la diminution de l'expression des miARNs est 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).

Au vu de ces différents profils de miARNs dans le muscle, 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 (par exemple la Créatine Kinase dont les niveaux sont influencés par l'âge et l'activité physique). 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), chez le chien GRMD (Jeanson-Leh *et al.* 2014) et chez des patients DMD (Zaharieva *et al.* 2013 ; Hu *et al.* 2014). 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 ambulants 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. Les miARNs circulants sont appelés ex-miARNs (pour miARN extracellulaires). Ils sont libérés dans la circulation dans des exosomes ou liés à des protéines : Argonaute ou lipoprotéines, ce qui permet leur stabilité dans le sang. Les mécanismes de libération dans le sang des miARNs circulants ne sont pas entièrement élucidés mais plusieurs hypothèses, sont proposées (Coenen-Stass *et al.* 2017) :

- les ex-miARNs proviendraient de fibres musculaires en nécrose dont le contenu cellulaire aurait été relargué,
- les ex-miARNs seraient relargués à travers la membrane par diffusion passive, dans des fibres musculaires dont le sarcolemme est altéré,
- les miARNs seraient relargués par les fibres en régénération de manière sélective et régulée et agiraient ainsi de façon paracrine sur leur gène cible, notamment sur les cellules satellites.

III.1.6 Modulation artificielle des miARNs

L'expression des miARNs est modulable par l'utilisation de différents oligonucléotides (Figure 20). Les mimics sont des oligonucléotides artificiels de séquences similaires aux miARNs et qui peuvent mimer l'effet des miARNs. Le miR-mimic possède une structure double-brin et va être pris en charge par Dicer qui va le processer. Il va ensuite être chargé par le complexe RISC et cibler l'ARNm cible de façon similaire au miARN endogène (Wang, 2011).

Les antimimics sont des oligonucléotides qui possèdent une séquence antisens à celle du miARN d'intérêt. Ils entrent ainsi en compétition avec les miARNs d'intérêt, leur séquence correspondant à celle de la cible du miARN. Ils peuvent également interférer avec la biogenèse du pri-miARN, son export nucléaire, la maturation du pré-miARN ainsi que le chargement du miARN au sein du complexe RISC.

Les mimics et les antimimics artificiels sont modifiés chimiquement afin d'améliorer leur stabilité. Ainsi, parmi les antimimics, on retrouve les antagomimics dont la structure comporte un groupement méthyle sur l'hydroxyle en position 2' des nucléotides (2'OMe), ainsi que des

groupements phosphorothioate, qui consistent à remplacer les groupements oxygène n'entrant pas dans les liaisons entre nucléotides, par des groupements sulfure (Krützfeldt *et al.* 2005). Il existe également des structures chimiques LNA (*Locked Nucleic Acid*) qui consistent à ajouter un pont méthylène entre l'hydroxyle en position 2 et le carbone 4 de l'ose afin de garantir la stabilité de l'oligonucléotide (Kurreck *et al.* 2002).

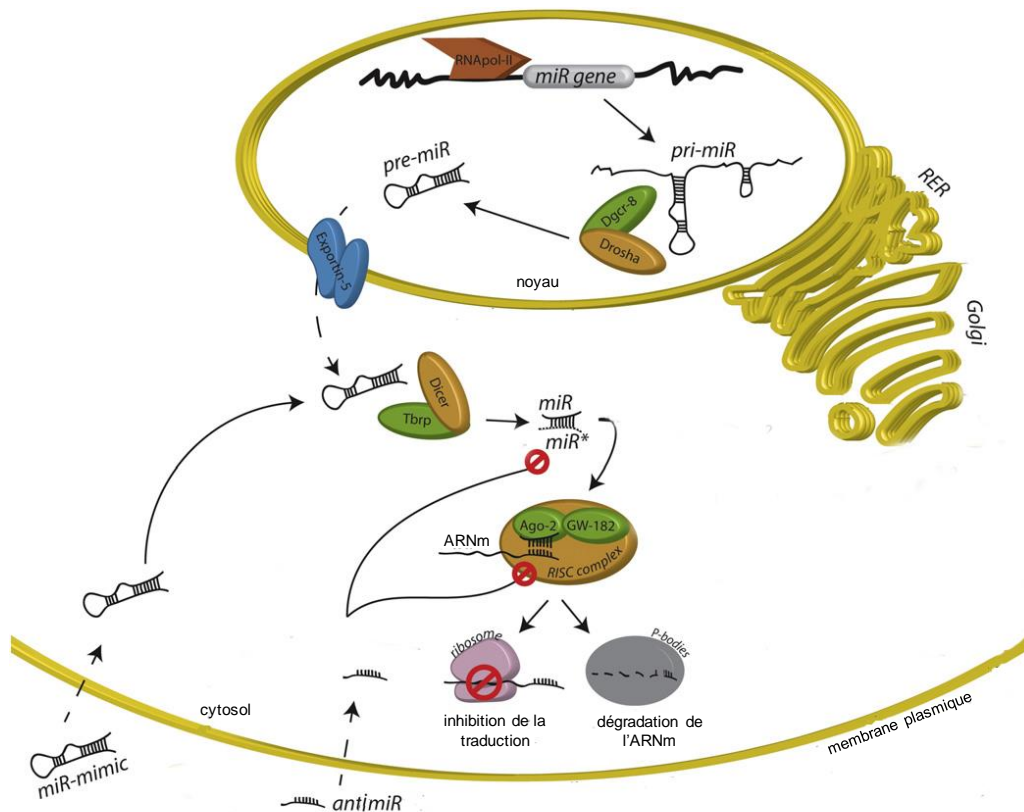


Figure 20 : Modulation artificielle des miARNs. Les effets des miARNs peuvent être mimés grâce aux miR-mimics ou inhibés grâce aux anti-miRs (adapté de Quattrocelli et Sampaoli, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015).

La modulation artificielle de miARNs représente un enjeu thérapeutique dans des maladies très diverses. Ainsi, il a été montré que le miR-122, un miARN exprimé dans le foie, était impliqué dans la réplication du virus responsable de l'hépatite C (HCV) (Van der Ree *et al.* 2014). En effet, le miR-122 va se lier au niveau du 5'UTR du HCV et ainsi augmenter la stabilité du génome viral dans la cellule. Un essai clinique de phase II a été effectué sur des patients atteints d'hépatite C. Cet essai a consisté à injecter en sous-cutané un anti-miR-122, le miravirsén (Santaris Pharma), de structure LNA et modifié avec des phosphorothioates, puis à donner un traitement antiviral pour éviter les rechutes observées dans un précédent essai. Ce

traitement combiné a montré des effets très encourageants puisque le HCV n'était plus détecté chez les patients traités avec la dose maximale de miravirsén, qui, par ailleurs, n'a pas entraîné d'effets toxiques sur le foie (Van der Ree *et al.* 2014).

De nombreuses applications thérapeutiques de modulations des miARNs sont actuellement en études pré-cliniques ou cliniques de phase I, notamment dans le traitement de certains cancers mais aussi dans des traitements antifibrotiques ou dans le traitement de la Sclérose Latérale Amyotrophique, une pathologie entraînant une dégénérescence rapide des muscles (Broderick et Zammore, 2011; miragen.com).

Les miARNs pouvant cibler plusieurs gènes et ayant une séquence relativement courte, une des limitations majeures de leur utilisation en thérapie est leur effet non-spécifique potentiel. L'inhibition thérapeutique d'un miARN pour un gène donné pourrait ainsi entraîner une perte ou un gain de fonction. Ainsi, le miR-122 aurait un rôle suppresseur de tumeur, l'apparition de carcinome hépatocellulaire est donc à étudier chez les patients traités au miravirsén.

III.2 Les longs ARN non-codants (lncARNs)

Après le séquençage du génome humain, l'enjeu a été de découvrir les gènes codés par ce génome. Dans ce cadre, il a été mis en évidence l'existence de transcrits de plus de 200 nucléotides qui ne possédaient pas de cadre de lecture permettant une traduction en protéine, et qu'on appelle donc des longs ARN non-codants (lncARNs) (Guttman et Rinn, 2012). Il a été montré par la suite que ces lncARNs possédaient une fonction régulatrice par l'intermédiaire de différents mécanismes (*cf. III.2.1*). Les lncARNs sont transcrits de façon similaire à l'ARNm, généralement par l'intermédiaire de l'ARN polymérase II (Ulitsky et Bartel, 2013). La plupart possèdent des profils épigénétiques, des séquences d'épissage et une queue poly(A) similaires aux ARNm. Ils sont généralement enrichis dans le noyau (Ulitsky et Bartel, 2013).

III.2.1 Mécanismes de régulation

De nombreux mécanismes différents sont décrits pour l'action des lncARNs, dont la plupart sont résumés ci-après.

- *Modification des histones et remodelage de la chromatine*

Les lncARNs peuvent agir sur leur gène cible en agissant sur le remodelage de la chromatine. En effet, le lncARN va recruter des régulateurs de la chromatine à proximité du locus d'intérêt (Guttman et Rinn, 2012). Les lncARNs peuvent également servir d'adaptateur en permettant l'interaction entre plusieurs protéines ce qui permettra par exemple l'inhibition du gène par modification des histones et remodelage de la chromatine (Rinn et Chang, 2012). C'est le cas d'un des premiers mécanismes de lncARN décrit, l'inactivation du chromosome X par le lncARN Xist (Guttman et Rinn, 2012). L'expression de la cible peut ainsi être activée ou inhibée par l'action des lncARNs (Figure 21A).

- *Régulation de la transcription*

Les lncRNAs pouvant induire la transcription (eARN pour *enhancer* ARN) agissent en *cis* sur les éléments géniques qui les entourent. Ils facilitent le recrutement de la machinerie transcriptionnelle au niveau des séquences promotrices des gènes cibles, notamment en permettant une structure en boucle de l'ADN (Quinn et Chang, 2016) (Figure 21B). Les lncARNs ont également une action inhibitrice sur la transcription, notamment en formant des interactions avec l'ADN (*RNA-DNA-Triplex*), au niveau du promoteur du gène cible ce

qui empêche l'action du facteur de transcription (Quinn et Chang, 2016) (Figure 21B). Les lncARNs peuvent aussi réguler l'expression de leur cible en agissant indirectement, comme « leurre » pour les facteurs de transcription ou pour les facteurs de remodelage de la chromatine. Ceux-ci vont en effet être séquestrés par le lncARN ce qui inhibera leur action (Ballarino *et al.* 2016) (Figure 21B).

- *Régulation de l'épissage*

Les lncARNs peuvent également réguler l'expression de leur gène cible en agissant sur le processus d'épissage soit en masquant un site d'épissage sur le pré-ARNm (Beltran *et al.* 2008) soit en modulant l'expression ou la localisation de facteurs d'épissage (Tripathi *et al.* 2010) (Figure 21C).

- *Régulation de la traduction*

Les lncARNs ont également un rôle régulateur de l'ARNm par interférence antisens, c'est-à-dire en bloquant la traduction de l'ARNm par complémentarité avec celui-ci ou en inhibant la stabilité de l'ARNm (Ballarino *et al.* 2016) (Figure 21D).

- *Régulation de petits ARNs interférents (siARNs)*

Au niveau du cytoplasme, les lncARNs peuvent lier des miARNs inhibant ainsi leur action (Ballarino *et al.* 2016) (Figure 21E). Les lncARNs peuvent également être des précurseurs de siARNs (Karlsson et Baccarelli, 2016) (Figure 21F).

- *Interactions protéines-protéines*

Les lncARNs peuvent également agir comme adaptateurs de complexes protéiques dans le cytoplasme, permettant de faciliter des interactions protéiques (Guttman *et al.* 2011) (Figure 21G).

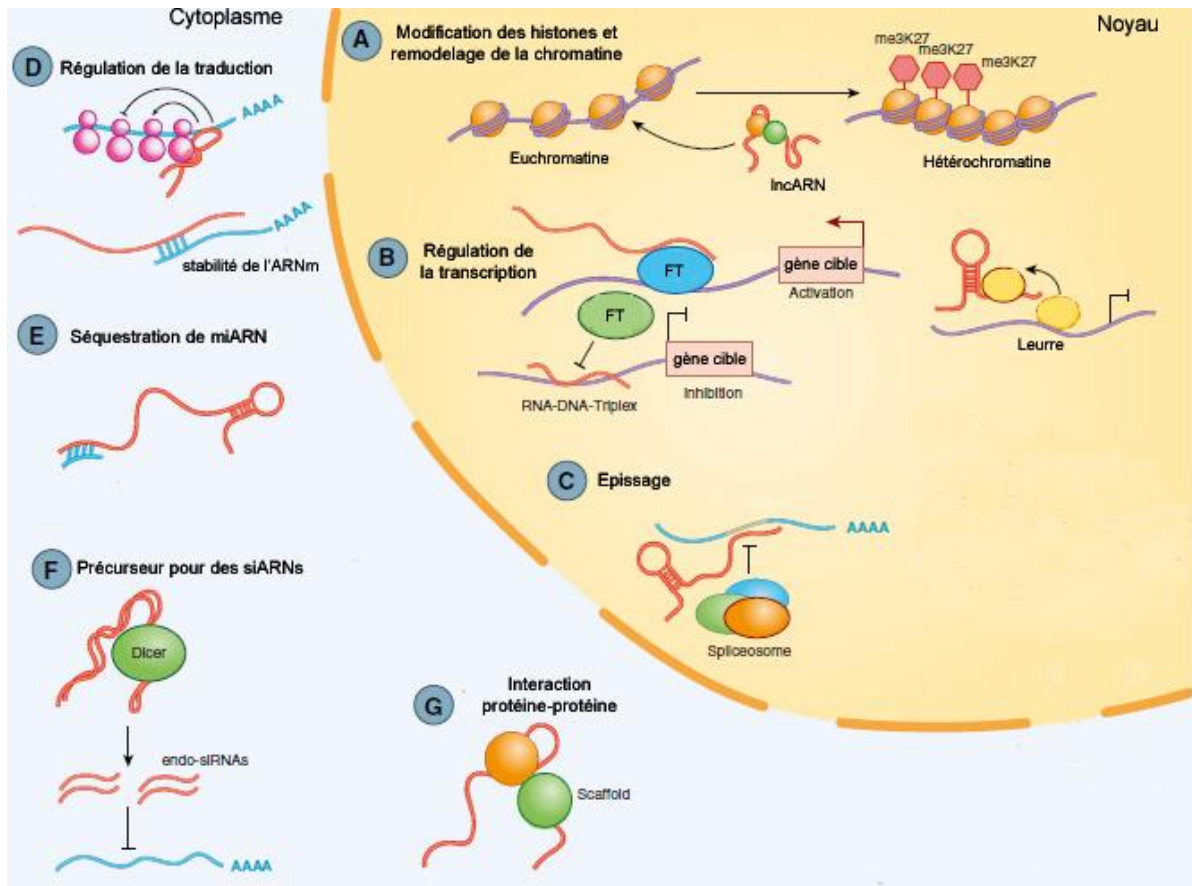


Figure 21 : Mécanismes de régulation des lincARNs dans le muscle. Les lincARNs agissent selon différents mécanismes : **A.** Remodelage de la chromatine, notamment en induisant la méthylation (me3K27) des histones. **B.** Régulation de la transcription par activation, inhibition, ou leurre de facteurs de transcriptions. **C.** Modulation de l'épissage. **D.** Régulation de la traduction par inhibition de la traduction ou déstabilisation de l'ARNm. **E.** Modulation de l'expression des miARNs. **F.** Précurseur de siARNs. **G.** Interactions protéiques par un rôle d'adaptateur (*adaptée de Karlsson et Baccarelli, Current Environmental Health Reports, 2016*).

III.2.2 lincARNs dans les dystrophinopathies

Les études sur des lincARNs dans le muscle sont peu nombreuses mais particulièrement pertinentes. Ainsi, une étude a montré l'existence d'un lincARN, linc-MD1, codé par le locus contenant les miR-206 et -133 (Cesana *et al.* 2011). Le miR-206 possède son propre promoteur mais le miR-133 est cotranscrit avec linc-MD1 au moment de la différenciation musculaire. Linc-MD1 agit comme une éponge de miR-133 et miR-135 et réduit ainsi leur activité, augmentant indirectement l'expression de *MAML1* et *MEF2C*, les gènes cibles de ces miARNs. *MEF2C* est un facteur de transcription qui active l'expression de nombreux gènes spécifiques du muscle et qui a un rôle dans la différenciation et le maintien de l'intégrité du sarcolemme (Cesana *et al.* 2011). *MAML1* est un coactivateur transcriptionnel de plusieurs voies de transduction dont la différenciation musculaire. Par ailleurs, l'expression de linc-

MD1 est réduite dans des myoblastes DMD. Ces données montrent l'importance de ce lncARN dans la différenciation musculaire et qui peut être relevant dans la physiopathologie de DMD.

Une autre étude a montré que lnc-31 était exprimé dans des myoblastes humains et murins en prolifération et que son expression était fortement diminuée pendant la différenciation (Ballarino *et al.* 2015). De façon intéressante, dans des myoblastes DMD, caractérisés par un retard de la différenciation, la diminution de l'expression de lnc-31 au cours de la différenciation est moins importante. Cette étude a montré qu'une inhibition de lnc-31 était liée à une réduction de l'expression de gènes du cycle cellulaire et une augmentation de l'expression de la myogénine, un facteur de différenciation musculaire (Ballarino *et al.* 2015). Le lnc-31 est exprimé à partir du même précurseur que le miR-31 mais de façon indépendante.

Enfin, une équipe a effectué une recherche des transcrits non-codants sur le gène *DMD* entier (Bovolenta *et al.* 2012). Les résultats montrent que le locus *DMD* exprime plusieurs lncARNs. De façon intéressante, une proportion significative de ces lncARNs sont décrits au niveau des introns qui abritent les promoteurs des différents transcrits du gène *DMD* ou qui flanquent le premier exon de ces transcrits parmi lesquels le ncINTMs2 dans l'intron 1 (proche du promoteur Dp427), les ncINT44s et INT44s2 dans l'intron 44 (flanquant le promoteur Dp140), les ncINT55s et INT55as (qui subit un épissage alternatif), dans l'intron 55 (proche du promoteur Dp116), et nc3UTRas au niveau de l'extrémité 3' non traduite du gène *DMD* (Figure 22). Cette étude montre que les lncARNs ncINT44s, INT44s2 et INT55s régulent le transcrit Dp427m du gène *DMD*, en ciblant la région promotrice de ce transcrit.

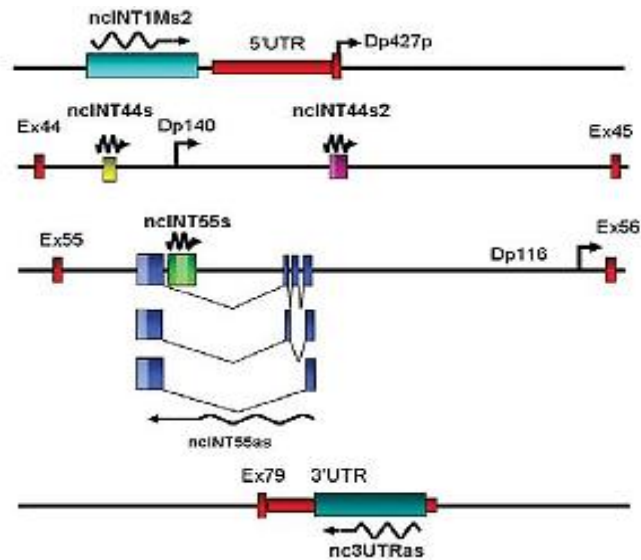


Figure 22 : Représentation schématique des lncARNs décrits dans le gène DMD. L'orientation de la transcription des lncARNs est indiquée par les flèches en zigzag. Leur position par rapport aux exons du gène DMD (rectangles verticaux rouges) ou aux extrémités non traduites (UTR, rectangles horizontaux rouges) et les promoteurs des isoformes (flèches droites) est montrée. Les couleurs plus claires dans les transcrits ncINT44s2, ncINT55s et ncINT55as indiquent des sites d'initiation ou de polyadénylation alternatifs. L'épissage alternatif du ncINT44s donne 3 transcrits qui sont représentés (Bovolenta et al. Plos One, 2012).

Objectifs

Une des stratégies thérapeutiques envisagées pour la DMD consiste à supprimer un ou plusieurs exons du gène *DMD* afin de rétablir le cadre de lecture transcriptionnel et de permettre l'expression de la Dystrophine et ainsi de passer d'un phénotype DMD à un phénotype BMD, plus modéré. Afin d'appliquer cette stratégie au plus grand nombre de patients possible, des approches thérapeutiques sont en cours pour déléter les exons 45 à 55 soit par saut d'exon thérapeutique au niveau du pré-ARNm du gène *DMD*, soit par édition génétique au niveau génomique avec le système CRISPR/cas9 (*cf.* I.3.5). En effet, cette approche pourrait permettre de corriger environ 63 % des patients DMD avec des délétions (Bérout *et al.* 2007).

La pertinence thérapeutique de cette stratégie peut être étudiée par l'étude clinique et phénotypique de patients BMD portant spontanément la délétion des exons 45 à 55 (BMDdel45-55).

Cette étude est d'autant plus importante que l'équipe de France Piétri-Rouxel a montré que de façon surprenante, ces patients présentent des différences phénotypiques importantes (Gentil *et al.* 2012). En effet, le statut clinique et le statut histologique sont très variables chez ces patients avec un spectre de phénotype allant d'un patient de 76 ans présentant un phénotype histologique comparable à un sujet sain et des symptômes cliniques modérés à des patients plus jeunes dont les coupes histologiques montrent des infiltrations d'adipocytes et de la fibrose importantes dans le muscle, associées à un score clinique plus élevé et donc à des phénotypes sévères.

L'équipe a précédemment montré une corrélation entre la perte de la localisation sarcolemmale et la sévérité du phénotype. En effet, des immunomarquages sur des biopsies de patients montrent une localisation de nNOS strictement cytosolique chez les patients avec un phénotype sévère alors qu'elle est localisée au moins en partie au sarcolemme chez les sujets sains et les patients avec un phénotype plus modérés (Gentil *et al.* 2012). De plus, chez tous ces patients une diminution de l'expression de nNOS a été observée comparativement au sujet sain.

Le projet global de cette thèse s'inscrit donc dans la nécessité de comprendre la différence phénotypique de patients portant la même délétion exonique en se focalisant sur l'implication

des ARN non-codants pouvant réguler des acteurs majeurs liés à la physiopathologie du muscle dystrophique. Deux voies d'investigation ont été choisies :

- Identifier des miARNs ciblant nNOS dans un contexte dystrophique.
- Identifier des différences de profils de lncARNs chez les patients BMDdel45-55.

Identifier des miARNs ciblant nNOS dans un contexte dystrophique

Plusieurs études ont montré une dérégulation des miARNs dans les dystrophinopathies (Eisenberg *et al.* 2007 ; Greco *et al.* 2009 ; Zaharieva *et al.* 2013 ; Hu *et al.* 2014). Par ailleurs, une équipe a démontré que la perte de la localisation sarcolemmale de nNOS empêche la nitrosylation de HDACs qui contrôlent l'expression de certains miARNs (Cacchiarelli *et al.* 2010) (*cf.* III.1.4). Ces données montrent un lien étroit entre l'expression de miARNs et la physiopathologie des dystrophinopathies. Par ailleurs, l'équipe de Piétri-Rouxel a montré une diminution de l'expression de nNOS au niveau ARNm et protéique chez les patients BMDdel45-55 (Gentil *et al.* 2012). Au vu de ces différentes données, nous avons émis l'hypothèse d'un lien entre l'expression de miARNs, l'expression de nNOS et la physiopathologie des patients BMD.

Identifier des différences de profils de lncARNs chez les patients BMDdel45-55.

Les introns 44 et 55 de part et d'autre des exons 45 à 55 délétés chez les patients BMDdel45-55 sont des régions non-codantes particulièrement grandes (près de 250 000 nucléotides pour l'intron 44 et plus de 120 000 nucléotides pour l'intron 55). Des lncARNs régulant l'expression de *DMD* ont été identifiés dans ces introns (Bovolenta *et al.* 2012) (*cf.* III.2.2). Les points de cassure introniques précis des patients BMDdel45-55 ne sont pas connus. Nous avons donc émis l'hypothèse que ces patients présentaient des profils de lncARNs différents qui pourraient expliquer les différences de phénotypes.

De plus, dans l'objectif global de trouver une explication aux différences de phénotypes observés chez les patients BMD, une approche structurale a été menée en collaboration avec l'équipe d'Elisabeth Le Rumeur.

Chapitre 2 :

Résultats et Discussions

I. Identification de miARNs régulant nNOS dans un contexte dystrophique

I.1 Hypothèse

La dérégulation de miARNs dans les dystrophinopathies (Eisenberg *et al.* 2007 ; Greco *et al.* 2009 ; Cacchiarelli *et al.* 2010 ; Zaharieva *et al.* 2013 ; Hu *et al.* 2014), la diminution de l'expression de nNOS chez les patients BMDdel45-55 (Gentil *et al.* 2012) et la dérégulation de l'expression de plusieurs miARNs par un accroissement de l'activité des HDACs en absence de nitrosylation nous ont amené à faire l'hypothèse d'un lien entre l'expression de miARNs et l'expression de nNOS chez les patients BMDdel45-55 dans un contexte dystrophique.

I.2 Résumé

Afin d'identifier des miARNs impliqués dans la régulation de nNOS dans un contexte dystrophique nous avons effectué un criblage de 617 miARNs par Taqman Low Density Array (TLDA) dans des biopsies musculaires de cinq sujets sains et de neuf patients BMDdel45-55. Les miR-31-5p (miR-31), miR-708-5p (miR-708), miR-34c-5p (miR-34c) et miR-212-3p (miR-212) ont été sélectionnés de cette étude car leur expression était accrue chez les patients BMDdel45-55 par rapport aux sujets sains ou chez les patients avec un phénotype sévère par rapport aux autres patients. De plus, une étude *in silico* nous a permis de déterminer que ces quatre miARNs pouvaient potentiellement cibler des séquences présentes dans le 3'UTR de *NOS1*.

Pour vérifier cette hypothèse la séquence du 3'UTR de *NOS1* a été introduite dans un plasmide en aval du gène codant la luciférase. Une diminution significative de l'activité luciférase a été observée lorsque les miR-31, -708 et 34c étaient surexprimés dans des cellules HEK293T transfectées avec le plasmide 3'UTR-*NOS1*-Luciférase.

Afin de valider ces données dans un contexte plus proche du muscle, l'effet de ces trois miARNs a été étudié dans des myoblastes humains contrôles et des myoblastes humains DMD (DMDdel45-52). Nous avons d'abord montré une diminution de l'expression protéique de nNOS lorsque les miR-708 et -34c étaient surexprimés dans des myoblastes contrôles. Nous avons validé que les myoblastes DMDdel45-52 présentaient une augmentation de l'expression endogène des miR-31, -708 et 34c et une diminution de l'expression de nNOS

comparés aux myoblastes contrôles, c'est-à-dire les mêmes caractéristiques que les patients BMDdel45-55. Ces données entérinent l'utilisation des myoblastes DMDdel45-52 comme modèle *in vitro*. Dans ces cellules, l'inhibition des miR-708 et -34c par la transfection d'anti-miARNs augmente l'expression de nNOS, confirmant que ces miARNs modulent l'expression de nNOS dans des myoblastes humains.

Enfin nous avons inhibé l'expression du miR-34c *in vivo*, par injection intramusculaire d'antagomiR-34c dans des *Tibialis Anterior* de souris *mdx*. Les résultats étant très hétérogènes et donc non exploitables, ces données seront traitées dans un paragraphe annexe à l'article (cf. I.4).

I.3 Article

MicroRNAs involved in nNOS regulation in dystrophic context

Marine Guilbaud¹, Christel Gentil¹, Cécile Peccate¹, Elena Gargaun¹, Isabelle Holtzmann¹, Carole Gruszczynski¹, Sestina Falcone¹, Kamel Mamchaoui¹, Rabah Ben-Yaouh^{1,2}, France Leturcq³, Laurence Jeanson-Leh⁴, France Piétri-Rouxel^{1*}

¹ *Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Centre de Recherche en Myologie, INSERM UMRS974, Institut de Myologie, 105 bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France*

² *AP-HP, Centre de Référence de Pathologie Neuromusculaire Nord, Est, Ile-de-France, G.H. Pitié-Salpêtrière, F-75013 Paris, France.*

³ *Laboratoire de Génétique Moléculaire, Hôpital Cochin, Paris, France*

⁴ *Généthon, 1 rue de l'Internationale, 91000 Evry, France*

** Corresponding author*

france.pietri-rouxel@upmc.fr

ABSTRACT

Duchenne (DMD) and Becker (BMD) muscular dystrophies are caused by mutations in *DMD* gene coding for Dystrophin, a protein being part of a large sarcolemmal protein scaffold that includes the neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS). The nNOS was shown to play critical roles in a variety of muscle functions and alterations of its expression and location in dystrophic muscle fiber leads to the disturbance of Nitric Oxide (NO) signaling and an increase of the muscle fatigability.

The present work focuses on factors that could regulate nNOS expression in dystrophic context. Previous observations suggested a link between the expression of nNOS and microRNAs (miRNA) expression profiles. In particular, an abnormal cytosolic location of nNOS leads to a deregulation of miRNA expression in DMD patients. We previously revealed a decrease of nNOS expression in BMD patients (BMDd45-55) all presenting a deletion of exons 45 to 55 in *DMD* gene, impacting the nNOS binding site of Dystrophin. Moreover, the degree of severity in the phenotype of these patients was correlated with the delocalization of nNOS into cytoplasm of fibers. Here, we screened the expression of 617 miRNAs in muscular biopsies of control subjects and BMDd45-55 patients using TLDA. Four miRNAs were selected for their overexpression in BMDd45-55 patients compared to controls and because they potentially could target the nNOS-3'UTR. To test this hypothesis, the nNOS-3'UTR was sub-cloned in a plasmid downstream the luciferase gene in HEK293 cells. Among the four miRNAs, miR-708, -34c and -31 induced a significant decrease of luciferase activity, confirming their interaction with nNOS-3'UTR. To validate these data in a muscular model, the effect of these three miRNAs was investigated on control and DMD human myoblasts (DMDd45-52). First, we showed a decrease of nNOS expression when miR-708 or -34c were overexpressed in control myoblasts. We then confirmed that DMDd45-52 cells displayed an increased endogenous miR-31, -708 and -34c expression and a decreased nNOS expression. Since DMDd45-52 showed the same characteristics observed in BMDd45-55 patients, they have been used as proper *in vitro* model to validate the relationship between miRNAs and nNOS. In DMDd45-52 cells we demonstrated that the inhibition of miR-708 and miR-34c increases nNOS expression, confirming that both miRNAs act on the nNOS-3'UTR and modulate its expression in human myoblasts.

Altogether, these results strongly suggest that miR-708 and -34c are new actors involved in the regulation of nNOS expression in dystrophic muscle.

INTRODUCTION

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a progressive and fatal X-linked neuromuscular disorder caused by mutations in Dystrophin gene (*DMD*) (Monaco *et al.* 1986, Koenig *et al.* 1987). The disease is due to mutations that disrupt the translational reading frame, leading to the loss of the protein Dystrophin expression. Mutations in *DMD* gene that preserve the open reading frame give a milder muscle disease (Becker Muscular Dystrophy or BMD), allowing the production of an abnormal truncated Dystrophin still retaining some functional capacity (Monaco *et al.* 1988, Koenig *et al.* 1989). This feature is the rationale of exon skipping therapy and genome editing strategies now in development (Goyenville *et al.* 2011, Nelson *et al.* 2016, Tabebordbar *et al.* 2016). The principle of these approaches is to delete one or multiple exons in order to obtain the production of a truncated Dystrophin, inducing a phenotypic conversion of DMD into BMD. To apply these strategies to a larger number of eligible patients, the skipping of exons 45 to 55 of *DMD* gene has been proposed since that could correct the reading frame in about 63% of DMD patients with deletions (Bérout *et al.* 2007, Young *et al.* 2016). Given the perspective of this approach, the therapeutic relevance of the resulting 45-55 truncated Dystrophin may be deduced from the clinical status of BMD patients carrying spontaneous deletion of exons 45 to 55 of *DMD* gene (BMDd45-55). Likewise, molecular investigations of factors involved in pathophysiological process occurring in muscle of these patients are of great interest.

Dystrophin is a 427 kDa protein that links the cytoskeleton to sarcolemma via the Dystrophin-associated protein complex (DAPC) (Ervasti *et al.* 1993). DAPC provides stability and integrity to the muscle membrane during contraction. The loss of Dystrophin leads to a breakdown of the DAPC complex and, as consequences, the muscle fibers become more sensitive to mechanical stresses, leading to muscle degeneration, chronic inflammation or increased fibrosis. Among the partners of the Dystrophin, the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) (Ohlendieck *et al.* 1993, Chang *et al.* 1996) was shown to play critical roles in a variety of muscle functions, including contraction, regeneration, atrophy, glucose uptake and blood perfusion (Stamler and Meissner. 2001) but also transcriptional regulation (Cacchiarelli *et al.* 2010). Three different isoforms of nNOS, namely nNOS α , nNOS β and nNOS μ were described to be expressed in skeletal muscle. The nNOS μ , the major one, contains a PDZ domain which allows its binding to the rod domain of the Dystrophin at the spectrin-like repeats 16 and 17 (R16/17) encoded by exons 42–45 (Baldelli *et al.* 2014). It has been shown that in absence of Dystrophin, nNOS μ expression decreased and was delocalized from the

sarcolemma of the muscular fibers (Brennan *et al.* 1987, Chao *et al.* 1996). Alteration of nNOS μ expression and location was described to contribute to DMD pathophysiology by the disturbance of NO signaling leading to an increase of the muscle fatigability (Kobayashi *et al.* 2008, Percival *et al.* 2008).

Our goal was to identify the molecular factors that can modulate the expression of nNOS and the muscular biopsies of BMDd45-55 patients was sought to be a pertinent tool. Indeed, in these patients, the deletion of the 45–55 exons in Dystrophin mRNA should partially delete the spectrin motif repeat 17 in the resulting protein and could alter the nNOS μ anchoring. A previous study revealed that the BMDd45-55 patients displayed variable clinical and histological phenotypes and a correlation between nNOS μ localization and the severe phenotype was showed (Gentil *et al.*, 2012). Additionally, a subsequent decrease of nNOS protein expression occurred in BMDd45-55 patients compared to healthy subjects. Furthermore, on DMD patients, the loss of nNOS sarcolemmal localization was described to lead to the deregulation of the expression of several microRNAs (miRNAs) (Cacchiarelli *et al.* 2010). miRNAs are short noncoding RNA that regulate mRNA post-transcriptionally either by promoting mRNA degradation or by inhibiting protein translation (Bartel *et al.* 2004). miRNAs have been shown to regulate functions of skeletal muscle both in normal and pathological states (Horak *et al.* 2016; Chen *et al.* 2006 and 2010; Cachiarelli *et al.* 2010). Moreover, several studies demonstrated a deregulation of miRNA expression profiles in dystrophinopathies (Greco *et al.* 2009; Cachiarelli *et al.* 2010; Vignier *et al.* 2013; Jeanson-Leh *et al.* 2014; Hu *et al.* 2014). Altogether, these studies suggest a link between miRNAs expression, nNOS expression and physiopathology of dystrophinopathies. Thus, the aim of the present study was to identify miRNAs that could modulate nNOS expression by screening the miRNAs profile in BMDd45-55 muscular biopsies.

RESULTS

miRNA expression profiling in BMDd45-55 muscular biopsies

To start our analysis, we took advantage of having a collection of muscle biopsies of Becker patients (BMDd45-55) bearing an in-frame deletion of exons 45 to 55 in the *DMD* gene and characterized from a genetic point of view (Gentil *et al.* 2012). This collection has been the subject of a preliminary study which showed notably a decrease in the expression of the protein nNOS in the muscle of the studied patients (Gentil *et al.* 2012). We examine here a

potential role of miRNA in the regulation of nNOS expression by investigating the expression levels of 617 miRNAs using Taqman Low-Density Array (TLDA) in muscular biopsies of 9 BMDd45-55 patients, compared to 5 control subjects (supplementary data 1). From TLDA data, we establish a list of miRNAs overexpressed in the muscles of BMDd45-55 patients with the criteria of a fold change higher than 2 and a p value less than or equal to 0.05. First, the analysis was carried out by comparing miRNA expression levels between BMDd45-55 and healthy muscles as control (Fig. 1a). A total of 66 miRNAs were identified based on the defined criteria of fold change and p value. Furthermore, the TLDA data were also analyzed by comparing the level of miRNAs expressed in muscles of severe patients with those expressed in muscles of all the other patients (Fig. 1b). This analysis allowed the identification of 29 miRNAs overexpressed. It should be noted that none of these 29 miRNAs were found in the list of miRNAs overexpressed in BMD muscles compared to healthy subjects (Fig. 1a), probably because of the too small number of severe muscle biopsies preventing the fold change value from being statistically significant when included to the values obtained for all the BMD patients.

miR-708-5p, miR-31-5p, and miR-34c-5p target 3'UTR sequences of *NOS1* gene.

To select miRNAs that could modulate nNOS expression, the total sequence of the 3'UTR of the *NOS1* gene (*NOS1*-3'UTR) was submitted to two predictive software that process alignment of the target sequence with human miRNAs databases (Fig. 2a). From this study, 12 and 24 miRNAs were identified by Target Scan Human and microRNA.org, respectively. Surprisingly, there was no common miRNAs between the two lists. Then, by combining in one hand the TLDA analysis that identified miRNAs displaying a fold change higher than 2, $p \leq 0.05$ and in another hand the *in silico* investigation data, 4 miRNAs named miR-31-5p (miR-31), miR-708-5p (miR-708), miR-34c-5p (miR-34c), and miR-212-3p (miR-212) were identified. Overexpression of these 4 miRNAs was then validated by performing individual RT-qPCR on 5 BMDd45-55 and 3 healthy muscular biopsies (Fig. 2c). A higher level of expression of the 4 miRNAs was detected in BMDd45-55 compared to control muscles with a fold change of 6.6, 4.4, 10.1 and 3.3 for miR-31, miR-708, miR-34c, and miR-212 respectively, confirming the results obtained by TLDA (Fig. 2b). Furthermore, by analyzing the sequence of the *NOS1*-3'UTR regarding the 4 selected miRNAs, we identified five sequences as potential targets of miR-31, five also for miR-708, nine for miR-34c and three for miR-212 (supplementary data 2 and Fig. 3a). Their ability to bind *NOS1*-3'UTR was then

tested *in vitro* using the luciferase reporter gene. If a miRNA would have interacted with *NOS1*-3'UTR, we would measure a decreased luciferase signal. Nevertheless, the *NOS1*-3'UTR being 7165 pb in length, it is too large to be fully cloned. Therefore, our strategy was to design 4 sequences (parts #1, #2, #3 and #4) which succeed one another and covering all the *NOS1*-3'UTR sequence (Fig. 3a). Each part was sub-cloned in a plasmid downstream of the luciferase gene and each of the four plasmids was co-transfected in HEK293T cells with one candidate or a non-specific control miRNA mimic. This strategy would also provide a more detailed information about the sequence of *NOS1*-3'UTR implicated in miRNA interaction. Our data showed a significant decrease of luciferase activity when the part #2 was co-transfected with the miR-31, the part #3 with the miR-708 and when the parts #1, or #3, or #4 were co-transfected with the miR-34c. Nevertheless, no decrease of the reporter gene was observed when miR-212 was co-transfected with the parts #1, #2, #3, nor #4. These results demonstrated that miR31, miR-708 and miR34c were able to target *NOS1*-3'UTR sequences leading to a decrease of the reporter gene firefly luciferase expression.

Altogether, these results demonstrate that these 4 miRNAs were overexpressed in the muscles of BMDd45-55 patients compared to control muscle or in severe patients compared to other patients and that only 3 of them could target sequences present in the *NOS1*-3'UTR and modulate reporter gene activity.

miR-31, miR-708 and miR-34c effect on nNOS expression in human myoblasts

In order to address the causal relationship between the overexpression of the 3 selected miRNAs and the nNOS expression in muscular context, we carried out experiments using immortalized human myoblasts from healthy subject (control) and from a patient displaying a deletion of the exons 45 to 52 (DMDd45-52) in the *DMD* gene (Mamchaoui *et al*, 2011). First, these DMDd45-52 myoblasts were validated as an appropriate cellular model regarding the expression of the 3 selected miRNAs. Quantification by RT-qPCR confirmed a higher level of expression for miR-31, miR-708 and miR-34c in DMDd45-52 cells compared to control with a fold change of 2.2, 2.2 and 3.8, respectively (Fig. 4a). Furthermore, the expression of nNOS protein was investigated by Western-blot and showed a significant decrease in DMDd45-52 compared to control cells (Fig. 4b). Additionally, immunostaining experiments, allowing the detection of the protein nNOS in the cytoplasm and into the nucleus of muscle cells, confirmed that nNOS staining was largely weaker in the DMDd45-52 compared to the control myoblasts (Fig. 4c). Overall, these results were consistent with those

obtained on BMDd45-55 muscle biopsies, namely a higher level of miR-31, miR-708 and miR-34c and a decrease in the expression of nNOS, thus allowing the use of these DMDd45-52 myoblasts as a suitable *in vitro* cellular model.

To evaluate the effects of the miR-31, miR-708 or miR-34c on the nNOS expression, each of them were transfected in control myoblasts (Fig. 5a). Overexpression of the miRNAs was verified by RT-qPCR (Fig. 5a). The location and expression of nNOS protein was first investigated by immunostaining on the transfected myoblasts (Fig. 5b). Analysis of the pictures showed a decrease of the nNOS labelling in the nuclei of cells overexpressing miR-708 or miR-34c. However, no effect on nNOS expression and location could be observed when miR-31 was overexpressed compared with myoblasts transfected with the non-specific control miRNA. The reduction in the nNOS level was confirmed by Western-blot experiments showing a decrease of about 30% of nNOS expression in cells overexpressing miR-708 or miR-34c, while no significant decrease could be observed in overexpressing miR-31 (Fig. 5c). Altogether, these results demonstrated that miR-708 or miR-34c could modulate nNOS expression in human healthy myoblasts.

In DMDd45-52 myoblasts, miR-708 and miR-34c expressions increased and nNOS expression decreased compared to control myoblasts (Fig. 4a, b, c), we thus investigated in these cells, the consequences of an inhibition of the miR-708 or the miR-34c, by using specific antisense oligonucleotides (antimir-708 or antimir-34c), on the nNOS expression level (Fig. 6). The inhibition of miR-708 or the miR-34c levels by their anti-miRNAs was validated by RT-qPCR experiments (Fig. 6a). In these cells, the nNOS location and expression were also investigated. Immunofluorescence experiments showed an increased staining in the nuclei of cells in which the miR-708 or the miR-34c were inhibited compared to cells transfected with a non-specific control miRNA (Fig. 6b). These results were confirmed by Western-blot experiments that showed a significant increase of 2.2 of nNOS expression in cells transfected with antimir-708 or antimir-34c (Fig. 6c).

DISCUSSION

In this study, we used a variety of bioinformatic, molecular and cell biological methods to demonstrate the role of miRNAs in the control of nNOS expression. We selected 4 miRNAs: miR-31, miR-708, miR-34c and miR-212 since they were overexpressed in muscular biopsies of BMDd45-55 patients compared to healthy subjects or in muscular biopsies of patients with severe phenotypes compared to other patients. We then determined, *in silico*, that these

miRNAs could target sequences in *NOS1*-3'UTR. A luciferase reporter study validated the targeting of *NOS1*-3'UTR by miR-31, -708 and -34c. Finally, we demonstrated that miR-708 and -34c could decrease nNOS expression in human healthy myoblasts and that their inhibition leads to an increase of this protein in DMD human cells.

Several studies showed a deregulation of miRNAs expression in muscles of DMD or BMD patients (Eisenberg *et al.* 2007; Greco *et al.* 2009; Cacchiarelli *et al.* 2011) or in serum of DMD patients (Zaharieva *et al.* 2013; Hu *et al.* 2014). Eisenberg *et al.* studied miRNA profile expression in ten muscular diseases and they showed an upregulation of 5 common miRNAs in these pathologies (Eisenberg *et al.* 2007). They showed also a particular miRNA expression profile for DMD patients shared with severe phenotype BMD patients but not with moderate phenotype BMD patients.

Among the selected miRNAs in our study, miR-31 was already shown to be overexpressed in *mdx* mice and in muscular biopsies of DMD patients (Greco *et al.* 2009, Cacchiarelli *et al.* 2011, Roberts *et al.* 2012). We found here the same results in muscular biopsies of BMDd45-55 patients, in DMDd45-52 myoblasts and in TA muscle of *mdx* mice (data not shown). Unlike our results, Cacchiarelli and colleagues didn't observe an increase of miR-31 expression in the biopsies of BMD patients. However, no information on *DMD* gene mutations and/or phenotypes was given for the patients included in this study. As we found a higher expression of miR-31 in severe phenotypes than in moderate phenotypes (Fig.2c), we assume that these patients had moderate phenotypes and therefore might not exhibit a high level of miR-31. The fact that miR-31 could target nNOS by mRNA decay was described in human atrial myocytes from patients with atrial fibrillation (Reilly *et al.* 2016). In this study, the precise targeted sequence was identified, and it appears to be the same that we identified by the system of cloning *NOS1*-3'UTR downstream luciferase reporter gene set up in our study (Fig.3). Surprisingly, our data revealed a slight decrease of nNOS expression by miR-31 overexpression in control human myoblasts. One reason could be the level of miR-31, indeed, in Reilly's work, miR-31 fold increase was 2.10^4 compared to control condition whereas in our study miR-31 increased by a factor of 4.10^3 (Fig.5a) and therefore not sufficient to exhibit a significant effect. However, we could not transfect more miR-31 because of deleterious effect of transfection on human myoblasts. Nevertheless, one has to consider that the complex regulation displayed by non-coding RNAs might be different according to the studied tissues.

Concerning miR-708 and miR-34c, our results showed an effect of these two miRNAs on nNOS expression in human healthy and DMD myoblasts. miR-708 is mostly described in

cardiac muscle, where it was proposed to be involved in myocardium regeneration. Indeed, its overexpression in newborn rodents leads to the differentiation of cardiac progenitors to cardiomyocytes by targeting *MAPK14*, a cell cycle gene (Deng *et al.* 2016). Otherwise, miR-708 expression is decreased in murine myoblasts atrophied by dexamethasone treatment, suggesting that miR-708 is involved in muscular development (Shen *et al.* 2013). For miR-34c, several studies described it as overexpressed in *mdx* mice and in DMD patients (Roberts *et al.* 2012, Greco *et al.* 2009). Our data were in the same way as miR-34c is overexpressed in BMDd45-55 patients, in DMDd45-52 myoblasts and in *mdx* mice (data not shown). This miRNA was shown as a promoter of differentiation of murine myoblasts targeting *YY1*, a transcription factor involved in cell proliferation (Wang *et al.* 2017) and of porcine satellite cells by inhibiting Notch1 signal pathway that is involved in satellite cells quiescence.

The present study revealed that the nNOS expression could be modulated by miR-708 and miR-34c. Our results clearly showed their effect at the protein level, although we didn't success to detect nNOS mRNA in myoblasts to demonstrate also the decay of its transcript. Interestingly, it should be noted that the isoform of nNOS that was detected in myoblasts by Western-blot is about 140 kDa in size. In mature skeletal muscle, the nNOS μ , a 165 kDa protein, is the major isoform, it is linked to Dystrophin at the level of its 16 and 17 spectrin-like repeats (encoded by exons 42 to 46 of the *DMD* gene) via its PDZ domain (Molza *et al.* 2015) and it is thus located mainly at the sarcolemma (supplementary data S4). However, this isoform seems too large to correspond to the nNOS isoform detected in myoblasts. Another isoform, the nNOS β which is 136 kDa in size and do not display the PDZ domain (Brenman *et al.* 1997), was described to be present in the Golgi apparatus of skeletal muscle fibers where it modulates the contractile apparatus (Baldelli *et al.* 2014) or at the sarcolemma of mice TA muscles (Baum *et al.* 2011). Western-blot experiments on human muscular biopsy of healthy subject showed a major 160 kDa in size nNOS isoform, as expected but also the 140 kDa isoform (supplementary data S4). Additionally, we described here that the nNOS protein was localized in the nuclei of human myoblasts, as shown by immunostaining experiments. Western-blots carried out on nuclear and cytoplasmic fractions confirmed that 140kDa nNOS was detected in nuclei of control and DMDd45-52 myoblasts (supplementary data S4). Furthermore, a protein of about 160kDa in size was only visible in nuclear extracts of both types of cells (supplementary data S4). These data were compared to those obtained from immunostaining experiments performed on DMD patient muscular biopsies which revealed nNOS expression in the nuclei of fibers of DMD muscle whereas nNOS is sarcolemmal in

control muscle as expected (supplementary data S4). Nuclear 160kDa nNOS localization has been already described during C2C12 differentiation (Aquilano *et al.* 2014). However, this study used a N-terminal nNOS antibody, that didn't allow the detection of nNOS- β , and therefore a 140kDa nNOS isoform. Our data suggest the presence of an isoform of nNOS not yet described in nuclei of myoblasts. At transcriptional level, the precise sequence of a transcript that encodes a nNOS of 140kDa in size is not described in data bases (Ensembl.org i.e). The complexity of the mechanisms modulating NOS1 transcription indicates that the nNOS isoform expressed in myoblasts and regulated by miR-34c and miR-708 has not been precisely identified and that information on the transcriptional regulation of its gene remains to be thorough.

The exact role of nNOS in nuclear compartment is still not well-defined. However, NO production has been designated as a key player which mediates epigenetic changes through the direct control of histone deacetylases (HDACs). Indeed, in the *mdx* mice defective for NO pathway, the activity of HDAC2 resulted to be specifically increased (Colussi *et al.* 2008). Profiling of human DMD patient myoblasts confirmed the dysregulation of miR-1, but also found a significant dysregulation in the expression of miR-29a both of which regulate a Dystrophin-nNOS-HDAC2 pathway (Cacchiarelli *et al.* 2010). In the present study, we could not exclude a link between nuclear nNOS location, HDAC2 nitrosylation and the modulation of the miR-31, miR-708 and/or miR-34c expression. Nevertheless, a study in its own right will be necessary to establish this link.

Altogether, the present work highlights two miRNAs overexpressed in dystrophic human muscle as modulators of nNOS expression. This work could explain some pathological consequences caused by nNOS deficiency (i.e. muscle fatigability due to vasodilatation deficiency, switch to glycolytic metabolism). An inhibition of miR-708 and/or miR-34c expressions could permit to rescue these defects by increasing nNOS expression. Furthermore, the expression and the sarcolemmal localization of the nNOS to the Dystrophin has been shown to be crucial for contractile activity and muscular strength recovery in the canine DMD model (GRMD) (Gentil *et al.* 2016). Thus, a therapeutic strategy combining the inhibition of miR-708 and -34c with the restoration of Dystrophin will most likely be a benefit for the improvement of phenotype of DMD and BMD patients.

MATERIAL AND METHODS

Ethic approvals

Muscle biopsies were collected from patients after informed consent and this study was performed with agreement from the Committee for the protection of persons (CPP) concerned.

Cohort of patients

Nine Becker Muscular Dystrophy (BMD) patients characterized for a deletion of exons 45-55 of *DMD* gene were studied. These patients were already described (Gentil et al, 2012). Indeed, the clinical status of the patients was scored using the Gardner–Medwin and Walton scale (GMWS) (Gardner-Medwin and Walton, 1974) and the histopathological status based on routine hematoxylin and eosin (HE) staining of muscle cryosections have been investigated showing a large histological disparity. These criteria allowed defining three classes of severity: (i) ‘mild’ (GMWS \leq 2 [i.e. still able to normally climb stairs] and normal muscle biopsy); (ii) ‘moderate’ (GMWS \leq 2 or mild dystrophic muscle biopsy); (iii) ‘severe’+ (GMWS \leq 2 and/ or dystrophic muscle biopsy) (Table 1). The 9 patients were biopsied at an age ranging from 9 to 69 years old for diagnostic purposes after informed consent. In addition, the five muscle biopsies used as healthy control muscles (Ctrl) were recovered as surgical wastes from orthopedic surgery of individuals without neuromuscular diseases. All human muscle biopsies were flash frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen and evaluated for Dystrophin and nNOS expression by Western blotting (Gentil *et al.* 2012).

Taqman Low Density Array (TLDA)

Total RNA (including miRNA and mRNA) were extracted from about 30 mg of muscular biopsy using the Nucleospin®miRNA kit from Macherey-Nagel. Total RNA (200 ng) was reverse-transcribed with the Megaplex Primer Pools A and B (human version 3), and miRNAs were quantified after a pre-amplification step, with TaqMan Array MicroRNA Cards A and B (human version 3) on the 7900HT Real Time PCR System (AB) according to the manufacturer’s guidelines. Relative quantification was performed with 2^{-dCT} method, using the mean of all miRNA expressed as normalizer.

miR-target predictions

The ability of candidate-miRNAs to target *NOS1-3’UTR* was evaluated with Diana-microT algorithm and Targetscan v6.2.

Individual RT-qPCR

30 mg of muscular biopsies from 3 healthy subjects and patients BMD1, 2, 4, 8 and 11 were extracted using the Nucleospin® miRNA kit (Macherey-Nagel). 100 ng of RNA were reverse-transcribed with Universal cDNA synthesis kit II (Exiqon) according to manufacturer's instructions. Complementary DNAs (cDNAs) were analyzed by real-time quantitative PCR performed on Light Cycler 480 instrument (Roche) using Exilent SyBR Green Master Mix (Exiqon). LNATM PCR Primers set from Exiqon were used for miRNA expression analysis (miR-212: 204170, miR-708: 204490, miR-34c: 205659, miR-31: 204236). miRNA expression was normalized on miR-30b-5p expression (204765) using $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Luciferase Assay

Genomic DNA was extracted from biopsy of healthy subject using Nucleospin® Tissue kit from Macherey-Nagel, following manufacturer's instructions. gDNA was eluted after incubation of the silica membrane 3 min, twice in 50µL of Elution Buffer BE, followed by centrifugation 1min for 11000 g, being 100µl of total gDNA.

NOS1-3'UTR (Ensembl: ENST00000618760) was cloned downstream of Firefly Luciferase gene in HSVTK-Luc3' modified plasmid. As this 3'UTR is 7183 pb in length, it is too large to be fully cloned in this plasmid. Therefore, we cut it in 4 overlapping parts using primers that add restriction sites (in italic) on gDNA fragments (supplementary data 3).

Fragments were amplified using Mastermix Phusion with the following protocol: 98°C 30s, 10 cycles of 98°C 10s, 58°C 30s and 72°C 1min and 20 cycles of 98°C 10s 61°C 30s and 72°C 1min, 72°C 10min.

Amplicons were purified with Nucleospin® Gel and PCR clean-up from Macherey-Nagel. 3'UTR parts were then cloned in HSVTK-Luc3' modified plasmid between *Xba*I and *Eco*RV sites.

Each 3'UTR construction (24,5 ng) was co-transfected in 293T-HEK cells with 25 pg of either miR-negative control (AM17111, Ambion), miR-212, miR-31, miR-34c or miR-708 (AM17100, Ambion) using lipofectamine 2000 diluted in Optimem reduced medium. The plasmid CMV-Renilla luciferase (0.25 ng) was also transfected in each condition as normalizer. 5 hours post-transfection, Optimem reduced-medium is replaced with DMEM added with FBS 10%. 24 hours after transfection Firefly and Renilla luciferase luminescences were quantified with Dual-Glo Luciferase Assay System (according to manufacturer's

instructions) on Flexstation 3 Microplate reader. Firefly luciferase activity was normalized on Renilla luciferase activity.

Human myoblasts transfection

Human immortalized myoblasts from a healthy subject (ctrl) and from a DMDd45-52 patient (DMDd45-52) were used (Mamchaoui et al, 2011). Myoblasts were plated 48 hours before transfection at $3 \cdot 10^4$ /well of 6-wells plate or $6 \cdot 10^3$ /well of 24-wells plate in proliferation medium composed of DMEM supplemented with $5 \mu\text{g/ml}$ of insulin, 5ng/ml of EGF, 0.5ng/ml of bFGF, $0.2 \mu\text{g/ml}$ of dexamethasone, $25 \mu\text{g/ml}$ of fetuin, 20% of fetal bovine serum and 16% of medium 199. Cells were transfected with 12.5 pg of either miR-negative control (AM17111, Ambion), miR-31, miR-34c, miR-708 (AM17100, Ambion), anti-miR-34c or anti-miR-708 (AM17000, Ambion) using lipofectamine 2000 diluted in Optimem reduced medium. 24 hours after transfection, transfection medium was replaced with proliferation medium for 24 hours.

miRNA expression

Cells were harvested in $300 \mu\text{l}$ of Buffer ML (Nucleospin© miRNA, Macherey-Nagel). Total RNA (small + large RNA) was extracted from lysed cells with Nucleospin© miRNA kit (Macherey-Nagel) following manufacturer's instructions. cDNA generated with Universal cDNA synthesis kit II (Exiqon) according to manufacturer's instructions was analyzed by real-time quantitative PCR performed on Light Cycler® 480 instrument (Roche) using Exilent Sybr Green Master Mix (Exiqon). LNATM PCR Primers set from Exiqon were used for miRNA expression analysis (miR-708: 204490, miR-34c: 205659, miR-31: 204236). miRNA expression was normalized on SNORD44 expression (203902) using $2^{-\text{dCT}}$ method.

Western blotting

For nNOS detection, cells were harvested in $50 \mu\text{l}$ of RIPA buffer (150mM NaCl, 50mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, pH 7.4, 5mM ethylene diamine tetra acetic acid, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1mM PMSF with a mix of protease inhibitors (Roche), and centrifuged 10min 1500g at 4°C .

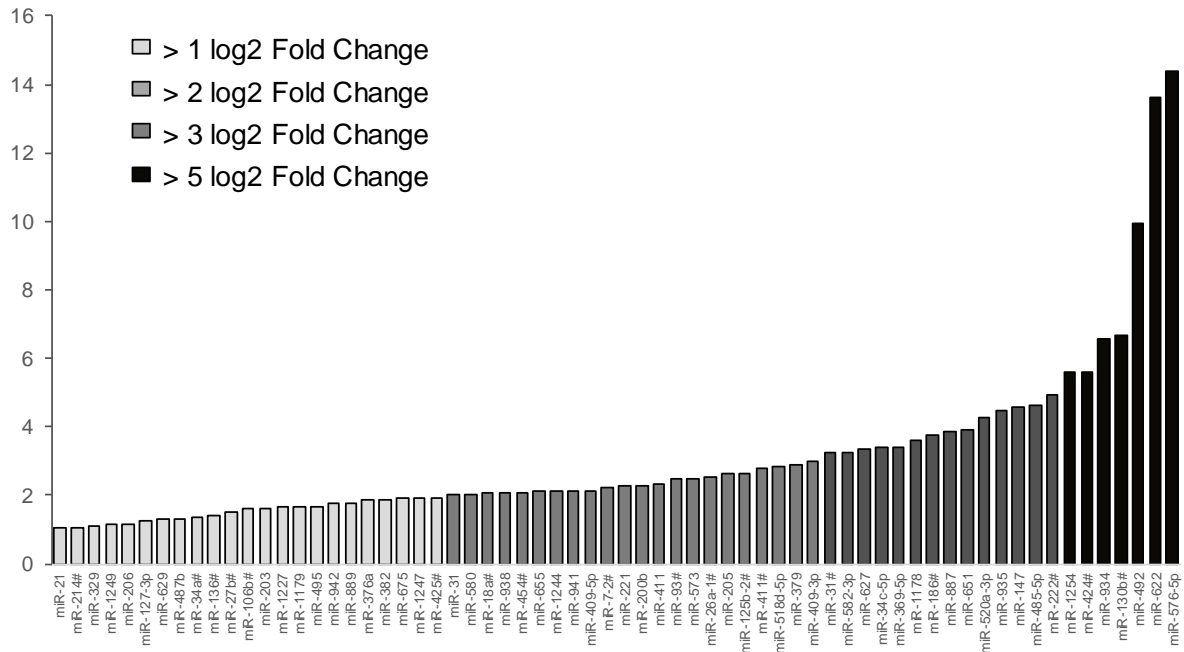
Protein extracts (20ng) were denatured in Laemli buffer 2X added of 20% of 2-mercaptoethanol 30 min at room temperature, incubated 15min in ice and then 15min at room temperature. Proteins were resolved by SDS-PAGE (4–12%, Invitrogen) and transferred to nitrocellulose. Membranes were blocked in tris buffered saline 0.1% Tween-20 with 5% non-fat dry milk 1h at room temperature and incubated overnight at 4°C , with rabbit polyclonal

nNOS antibody (R-20, Santa Cruz, 1:100) or with mouse monoclonal GAPDH antibody (MAB9748, Tebu-Bio, 1:8000). After washes in TBS 0.1% Tween, membranes were incubated for 1 hour at room temperature with secondary antibodies: goat anti-rabbit-horseradish peroxidase (HRP) (1/50 000) or sheep anti-mouse HRP (1/15 000) (Jackson Immunoresearch). Western blots were revealed with enhanced chemiluminescence (Thermo Scientific) with Image Quant LAS 4000 system (GE Healthcare Life Sciences).

Immunostaining

Cells in 24-wells plate were washed with PBS and fixed with Paraformaldehyde 4% 10 min at room temperature and washed 3 times in PBS. Fixed cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), washed and blocked in PBS/5% bovine serum albumin (BSA) for 40 min at room temperature. Cells were then incubated in PBS/1% BSA/0.1% Saponin with a goat polyclonal anti-nNOS antibody (Ab1376, Abcam, 1:500), overnight at room temperature, washed in PBS/1%BSA/0,1% saponin, incubated for 1 hour with secondary antibody: Donkey anti-goat (Alexafluor 594 conjugate, Life Technologies, 1:500) and with DAPI (1:5000, Sigma). Fixed cells were then thoroughly washed in PBS/1% BSA/0.1% Saponin and then in PBS, and mounted in Fluoromount (Southern Biotech). Images were acquired with Leica DM2500 confocal microscope using x63 objective.

a



b

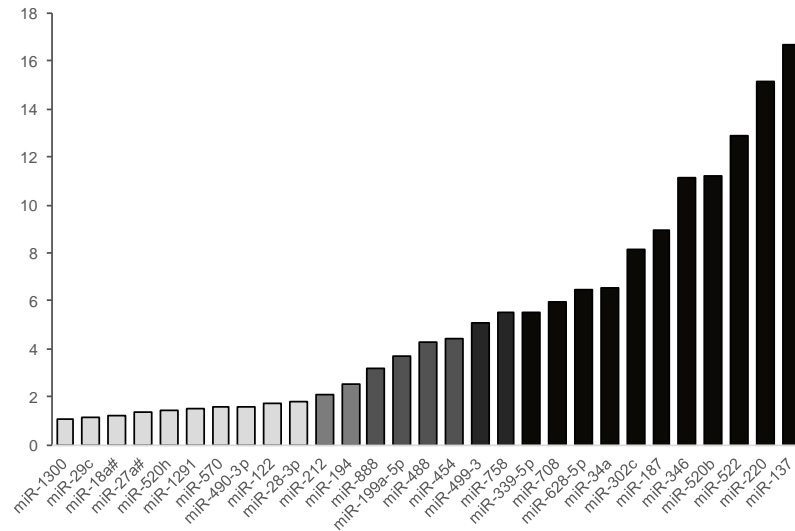
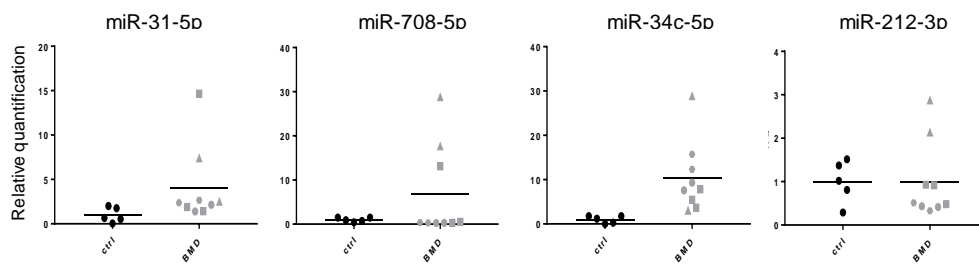


Fig. 1: Screening of miRNA expression profiling by TLDA in BMD45-55 muscular biopsies. Data of TLDA were expressed by the value of Log2(R), where R is the ratio of the average of the relative quantification (RQ) obtained in BMDd45-55 muscles on the average of RQ values obtained from muscle of healthy subjects (a); or obtained from muscles of severe BMDd45-55 patients on the average of RQ values obtained from muscle of the moderate and mild BMDd45-55 patients (b), $p \leq 0.05$

a

microrna.org	TargetScanHuman v6.2
miR-144	<u>miR-31-5p</u>
miR-199b	miR-24/24ab/24-3p
<u>miR-212-3p</u>	miR-761
miR-214	miR-3619-5p
miR-132	miR-214
miR-28-5p	miR-761
<u>miR-708-5p</u>	miR-3619-5p
miR-874	<u>miR-34ac/34bc-5p</u>
miR-24	miR-449abc/449c-5p
miR-876-5p	miR-15abc
miR-376a/376b	miR-16/16abc
miR-495	miR-195
	miR-322
	miR-424
	miR-146ac/146b-5p
	let-7
	miR-98
	miR-4458
	miR-4500
	miR-103a
	miR-107/107ab
	miR-18ab
	miR-4735-3p
	miR-503

b



c

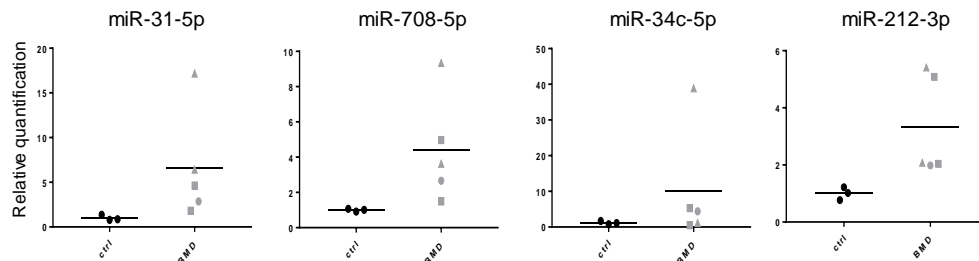
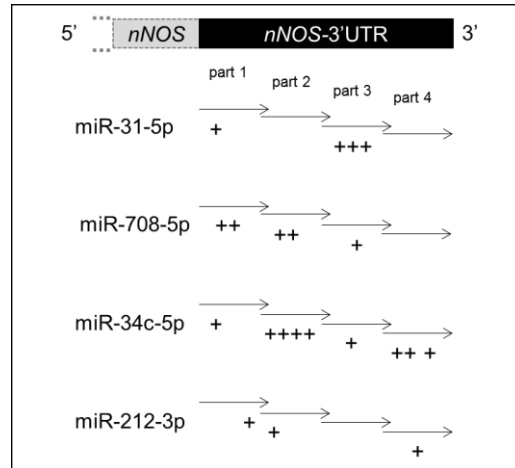


Fig. 2: Selection of candidate miRNAs. a) *In silico* screening of miRNAs that could target *NOS1* (Target Scan Human and microRNA.org). Candidate miRNAs are underlined. b) TLDA values of candidate miRNAs expression in healthy subject biopsies (ctrl, black circle) and BMDd45-55 patients with asymptomatic phenotype (grey circle), moderate phenotype (grey square), severe phenotype (grey triangle) or not determined phenotype (grey hexagon), data are normalized on average of control expression. Lines represent average of each group. c) Validation of miRNA expression by individual RT-qPCR in healthy subject biopsies (ctrl, black circle) and BMDd45-55 patients with asymptomatic phenotype (grey circle), moderate phenotype (grey square) or severe phenotype (grey triangle). Data are normalized on average of control expression. Lines represent average of each group. Data are expressed as relative quantification using miR-30b as normalizer, normalized on average of control expression.

a



b

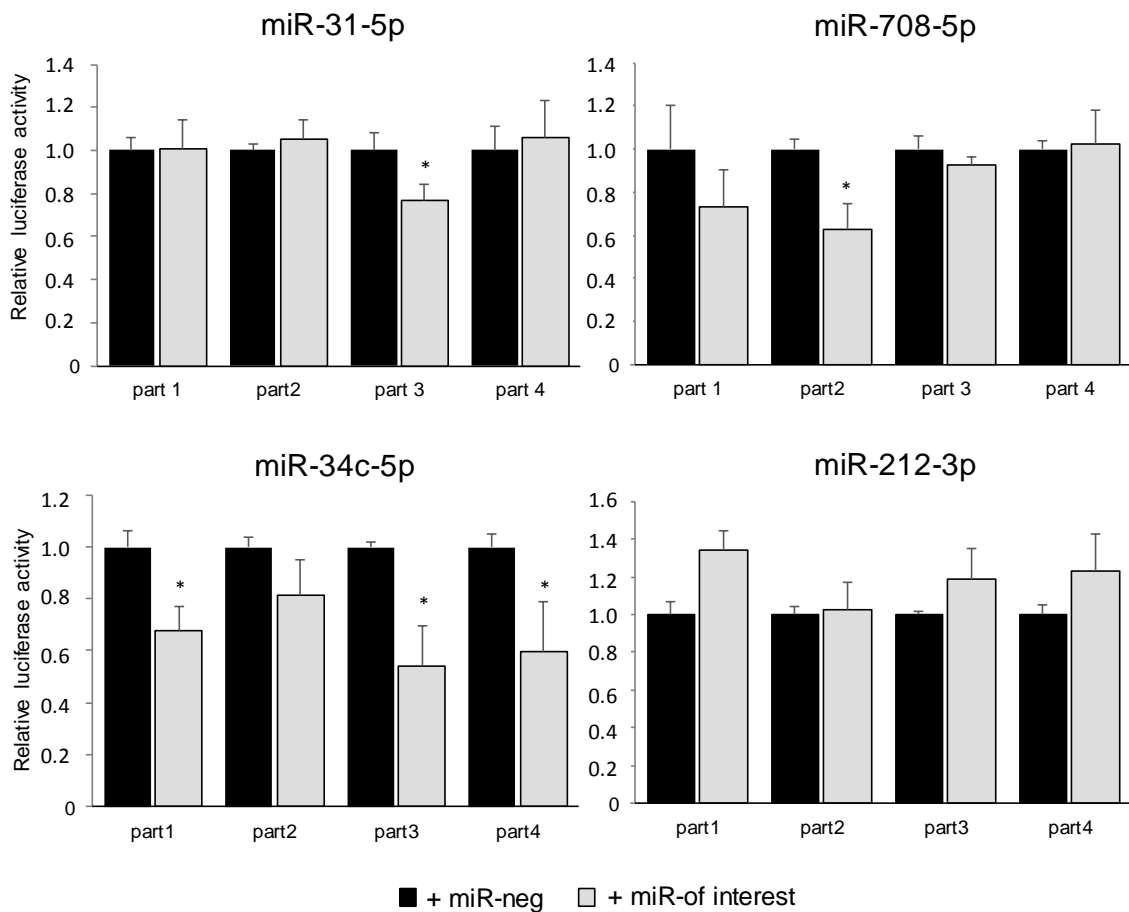


Fig. 3: miR-31, miR-708 and miR-34c targeted 3'UTR sequences of *NOS1* gene. a) Schematic positions of predicted binding sites by microT-CDS Diana Tools in 4 parts of 3'UTR of *NOS1*. b) Relative luciferase activity of indicated miRNA transfected cells normalized on luciferase activity in non-specific miRNA transfected cells (miR-neg). Cells were transfected with part 1, part 2, part 3 or part 4 of *NOS1*-3'UTR and with either miR-neg control (black bar) or miR of interest (grey bar). $p < 0,05$.

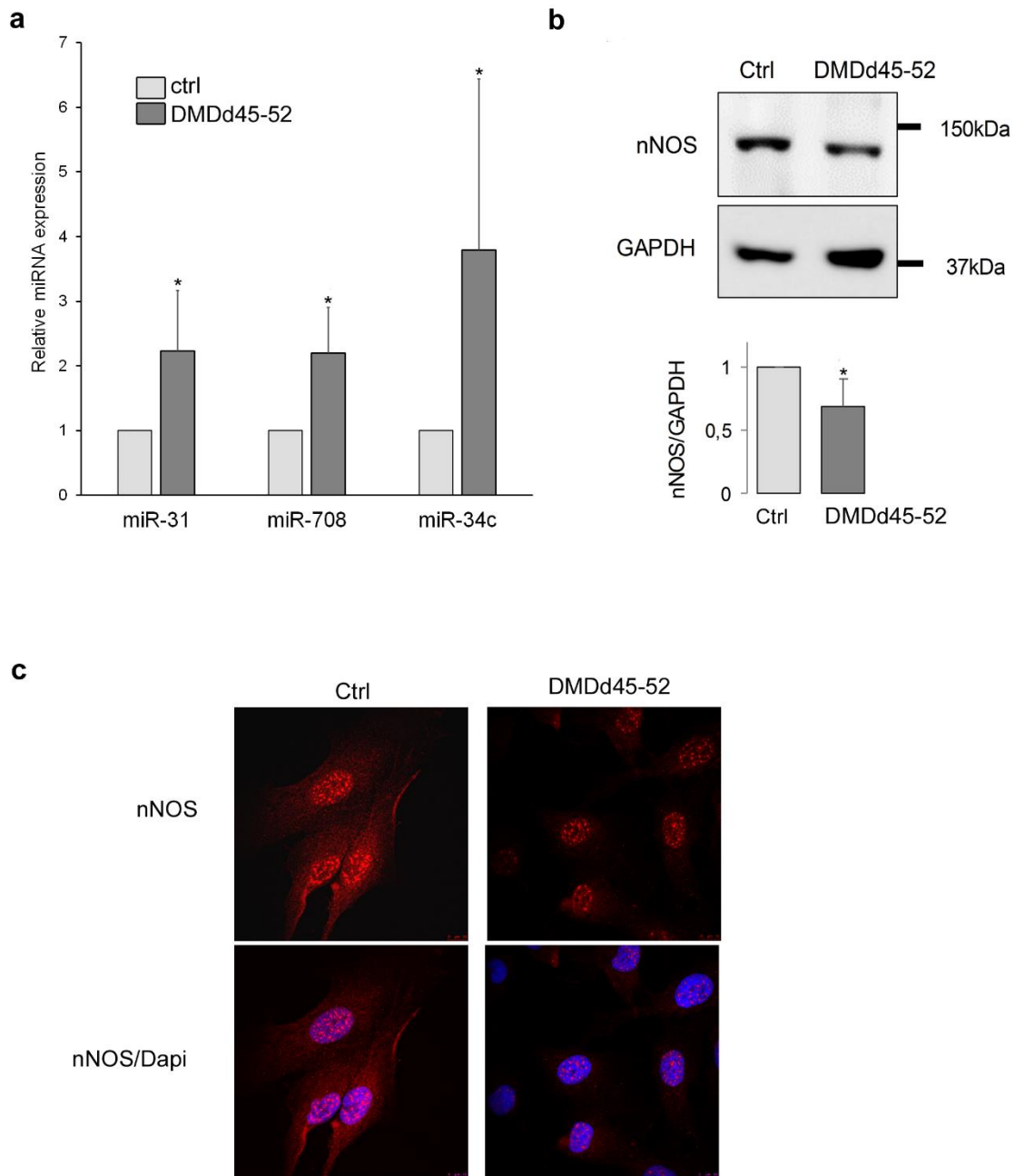
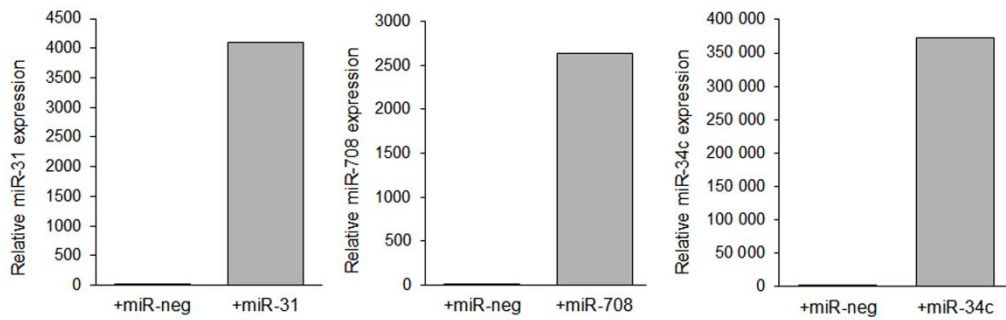
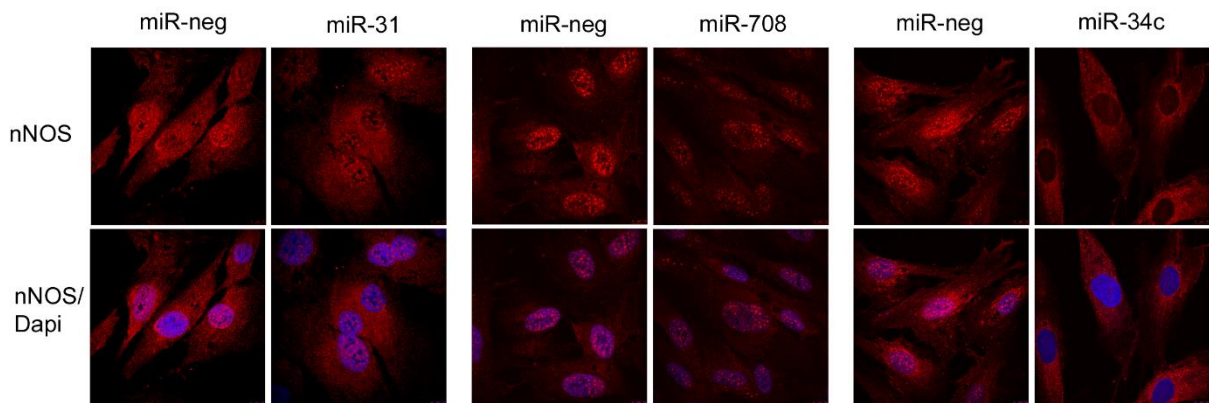


Fig. 4: miR-31, miR-708, miR-34c and nNOS expression in DMD myoblasts. **a)** miRNA expression in control human myoblasts and DMDd45-52 human myoblasts. Graph represents relative quantification of miRNA normalized on SNORD44 expression. miR-708 n=7, miR-31 n=7 et miR-34c n=8. **b)** nNOS immunoblot in control and DMDd45-52 cells. GAPDH serves as the loading control. Bar graph show quantification results average of 8 independant experiments. **c)** Control myoblasts immunolabelled with anti-nNOS (red) antibody, nuclei with Dapi (blue) and imaged by confocal microscopy. Obj x63 Representative of 3 independent experiments.

a



b



c

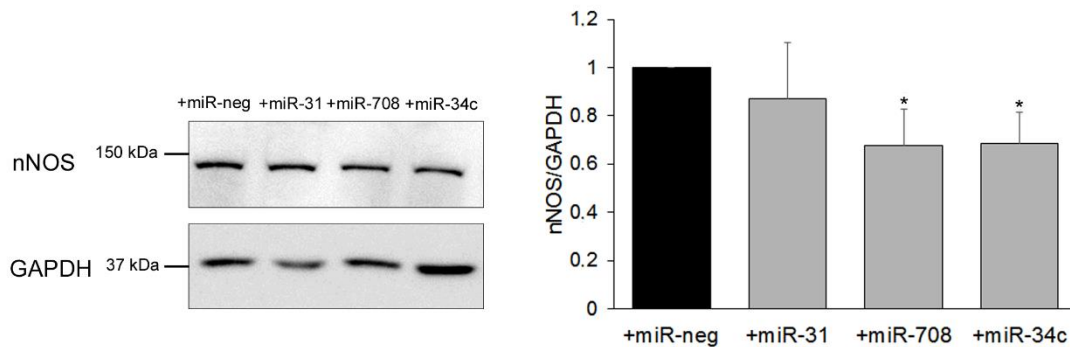


Fig. 5: miR-708 and miR-34c overexpression inhibit nNOS expression in transfected control human myoblasts. a) miRNA expression in control human myoblasts transfected with non-specific control miRNA (miR-neg, black bar) or indicated selected miRNA (grey bar). Graph represents relative quantification of miRNA normalized on SNORD44 expression. **b)** Control myoblasts immunolabelled with anti-nNOS (red) antibody, nuclei with Dapi (blue) and imaged by confocal microscopy. Obj x63. Representative of 4 independent experiments. **c)** nNOS immunoblot in transfected control human myoblasts. GAPDH serves as the loading control. Bar graph show quantification results average of 5 independent experiments.

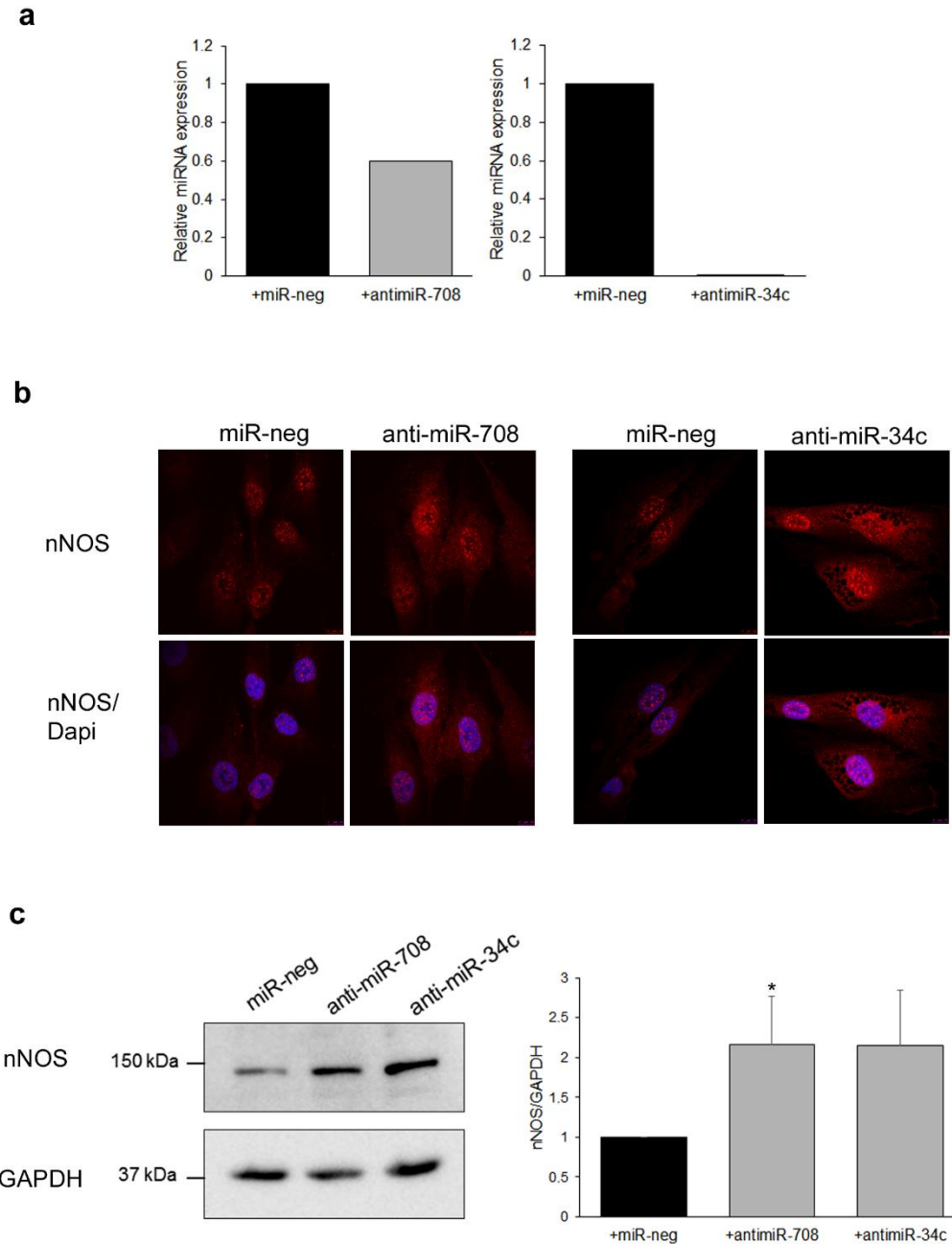


Fig. 6 : Inhibition of miR-708 and miR-34c increased nNOS expression in transfected DMDd45-52 human myoblasts. a) miRNA expression in DMDd45-52 human myoblasts transfected with control non-specific miRNA (miR-neg, black bar) or indicated selected anti-miRNA (grey bar). Graph represents relative quantification of miRNA normalized on SNORD44 expression **b)** DMDd45-52 myoblasts immunolabelled with anti-nNOS (red) antibody, nuclei with Dapi (blue) and imaged by confocal microscopy. Obj x63. Representative of 5 independent experiments. **c)** nNOS immunoblot in transfected DMDd45-52 human myoblasts. GAPDH serves as the loading control. Bar graph show quantification results average of 5 independent experiments.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

SUPPLEMENTARY METHODS

Nuclear and Cytoplasmic protein extraction.

Cells were harvested in trypsin and nuclear and cytoplasmic proteins were extracted with NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (ThermoFisher scientific) according to manufacturer's instructions. Western-blotting were performed as described in Material and Methods.

Immunostaining of human muscular biopsies sections.

Sections were cut at 8 μ m on a cryostat, permeabilized by 0.5% Triton X-100 and blocked in phosphate-buffered saline (PBS)- 4% bovine serum albumin (BSA) for 1 hr. Sections were incubated in PBS-4% BSA-0.1% Triton X-100 with primary goat polyclonal anti nNOS antibody (Abcam) overnight at room temperature and washed in PBS. Sections were then incubated with secondary antibody for 1 hr, washed in PBS, incubated with DAPI for nuclear staining, and mounted in Fluoromount-G (Clinisciences). Images were acquired on Leica SPE confocal microscope.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data 1 : Clinical and histopathological phenotypes compared with nNOS μ expression in BMDd45-55 patients. (*) N = normal; +/- = mild dystrophy; + and ++ = severe dystrophy; nd = not done. (**) +/- = traces or not detectable in Western-blot; + = weak; ++ = normal

<i>Name</i>	<i>Severity class</i>	<i>Age at muscle biopsy</i>	<i>Histopathological status (*)</i>	<i>nNOSμ protein expression (**)</i>
Ctrl 1		26	N	++
Ctrl 2		40	N	++
Ctrl 3		10	N	++
Ctrl 4			N	++
Ctrl 5			N	++
Patients				
BMD 1	Moderate	35	+/- (35)	+/-
BMD 2	Severe +	13	+ (13)	+
BMD 4	Severe +	30	++ (33)	+
BMD 7	Moderate	19	+/- (40)	+
BMD 8	Moderate	12	+/- (12)	+/-
BMD 11	Mild	69	N (69)	+
BMD 12	Moderate	18	+/- (18)	+/-
BMD 18	ND			
BMD 31	ND			

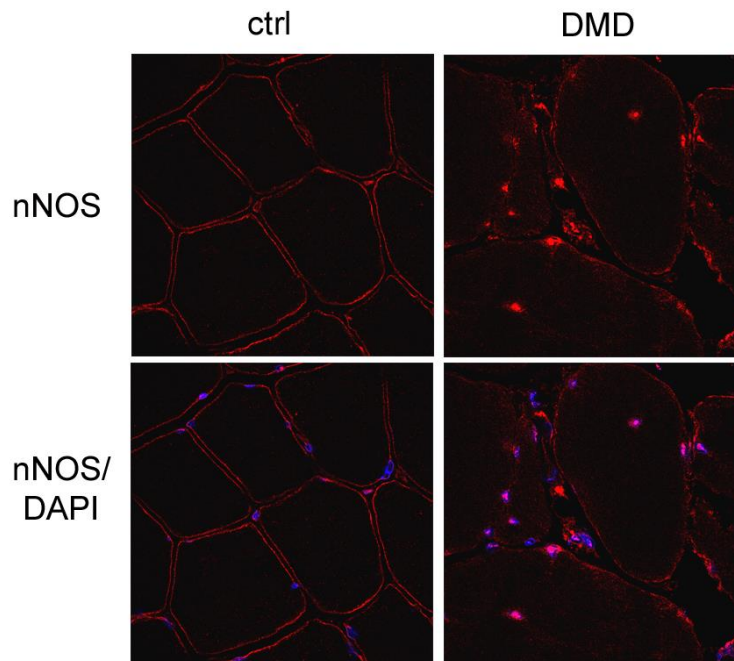
Supplementary data 2: predictive candidate-miRNAs binding sites on the human NOS1 3'UTR

miRNA	position in <i>NOS1</i> 3'UTR
212-3p	1729-1757 2066-2094 6700-6728
708-5p	152-180 382-410 1982-2010 2191-2219 5167-5195
31-5p	232-260 4349-4377 4593-4621 4728-4756 6156-6184
34c-5p	67-95 1844-1872 2208-2236 3286-3314 3313-3341 4882-4910 5368-5396 5478-5506 5488-5516 5778-5806
376b	1759

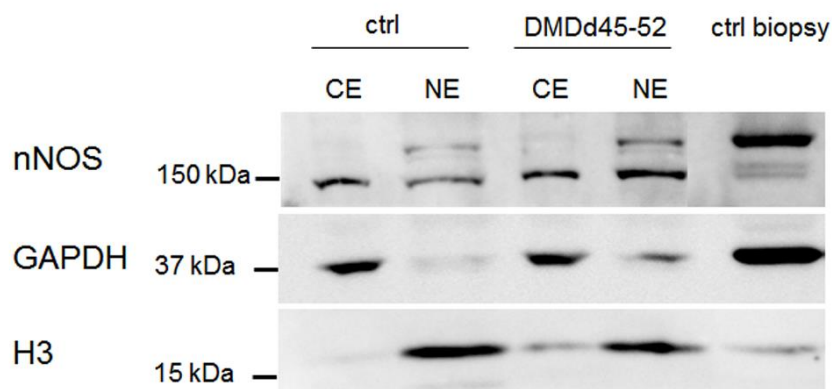
Supplementary data 3: Primers used to fragment *NOS1-3'UTR*. Added restriction sites are indicated in bold characters (XbaI and EcorV).

(position in 3'UTR)	Forward primer	Reverse primer
part 1 (1-1896)	F1-5'-TTGT CTAG ACTGGACCCTCTTGCCACAGC-3'	R1-5'-AAG GATAT CCAGGGGAAATTGGGATTAAAGG-3'
part 2 (1773-3685)	F2-5'-AACT CTAG ACTATGACTCACCTTGCTCTGC-3'	R2-5'-ATC GATAT CCTTACATGCTCCCTGTCCGTG-3'
part 3 (3607-5523)	F3-5'-AATT CTAG ACTGGTAGCTTCTGGAAGGTAAG-3'	R3-5'-AAT GATAT CGCCACAAGGCAGGGACTGGC-3'
part 4 (5358-7149)	F4-5'-TAGT CTAG AAGAACACAGGTCTGAGGGTCTG-3'	R4-5'-CC GATAT CATTGTAACCATAATGCAAACAAGC-3'

a



b



Supplementary data 4: Nuclear localization of nNOS in DMD muscular biopsy and in myoblasts. **a)** Control (ctrl) and DMD human muscular biopsy sections immunolabelled with anti-nNOS (red) antibody, nuclei with Dapi (blue) and imaged by confocal microscopy. Representative of 4 DMD patients. **b)** nNOS, GAPDH and Histone H3 (H3) immunoblots on cytoplasmic (CE) and nuclear (NE) protein extracts from control (ctrl) and DMDd45-52 myoblasts and total extract of control human muscular biopsy (ctrl biopsy).

AKNOWLEDGMENTS

We thank Philippos Mourikis, Frédéric Auradé and Nicolas Vignier to provide us Luciferase plasmids, primers and technical advices.

REFERENCES

- Aquilano, K., Baldelli, S., and Ciriolo, M.R. (2014). Nuclear Recruitment of Neuronal Nitric-oxide Synthase by α -Syntrophin Is Crucial for the Induction of Mitochondrial Biogenesis. *J Biol Chem* 289, 365–378.
- Baldelli, S., Barbato, D.L., Tatulli, G., Aquilano, K., and Ciriolo, M.R. (2014). The role of nNOS and PGC-1 α in skeletal muscle cells. *J Cell Sci* 127, 4813–4820.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297.
- Bérout, C., Tuffery-Giraud, S., Matsuo, M., Hamroun, D., Humbertclaude, V., Monnier, N., Moizard, M.-P., Voelckel, M.-A., Calemard, L.M., Boisseau, P., *et al.* (2007). Multiexon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63% of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mutat.* 28, 196–202.
- Brenman, J.E., Xia, H., Chao, D.S., Black, S.M., and Bredt, D.S. (1997). Regulation of neuronal nitric oxide synthase through alternative transcripts. *Dev. Neurosci.* 19, 224–231.
- Cacchiarelli, D., Martone, J., Girardi, E., Cesana, M., Incitti, T., Morlando, M., Nicoletti, C., Santini, T., Sthandier, O., Barberi, L., *et al.* (2010). MicroRNAs Involved in Molecular Circuitries Relevant for the Duchenne Muscular Dystrophy Pathogenesis Are Controlled by the Dystrophin/nNOS Pathway. *Cell Metabolism* 12, 341–351.
- Cacchiarelli, D., Incitti, T., Martone, J., Cesana, M., Cazzella, V., Santini, T., Sthandier, O., and Bozzoni, I. (2011). miR-31 modulates Dystrophin expression: new implications for Duchenne muscular dystrophy therapy. *EMBO Rep* 12, 136–141.
- Chang, W.J., Iannaccone, S.T., Lau, K.S., Masters, B.S., McCabe, T.J., McMillan, K., Padre, R.C., Spencer, M.J., Tidball, J.G., and Stull, J.T. (1996). Neuronal nitric oxide synthase and Dystrophin-deficient muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9142–9147.
- Chao, D.S., Gorospe, J.R., Brenman, J.E., Rafael, J.A., Peters, M.F., Froehner, S.C., Hoffman, E.P., Chamberlain, J.S., and Bredt, D.S. (1996). Selective loss of sarcolemmal nitric oxide synthase in Becker muscular dystrophy. *J. Exp. Med.* 184, 609–618.
- Chen, J.-F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., Conlon, F.L., and Wang, D.-Z. (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 38, 228–233.
- Chen, J.-F., Tao, Y., Li, J., Deng, Z., Yan, Z., Xiao, X., and Wang, D.-Z. (2010). microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J Cell Biol* 190, 867–879
- Colussi, C., Mozzetta, C., Gurtner, A., Illi, B., Rosati, J., Straino, S., Ragone, G., Pescatori, M., Zaccagnini, G., Antonini, A., *et al.* (2008). HDAC2 blockade by nitric oxide and histone deacetylase inhibitors reveals a common target in Duchenne muscular dystrophy treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19183–19187.

- Elfering, S.L., Sarkela, T.M., and Giulivi, C. (2002). Biochemistry of Mitochondrial Nitric-oxide Synthase. *J. Biol. Chem.* 277, 38079–38086
- Ervasti, J.M., and Campbell, K.P. (1993). A role for the Dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J. Cell Biol.* 122, 809–823.
- Gardner-Medwin, D. and Walton, J.N. (1974) The clinical examination of the voluntary muscles In Walton, J.N. (ed.), *Disorders of Voluntary Muscles*. Churchill-Livingstone, Edinburgh, London, pp. 517–560
- Gentil, C., Leturcq, F., Ben Yaou, R., Kaplan, J.-C., Laforet, P., Péniisson-Besnier, I., Espil-Taris, C., Voit, T., Garcia, L., and Piétri-Rouxel, F. (2012). Variable phenotype of del45-55 Becker patients correlated with nNOS μ mislocalization and RYR1 hypernitrosylation. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3449–3460.
- Gentil, C., Le Guiner, C., Falcone, S., Hogrel, J.-Y., Peccate, C., Lorain, S., Benkhelifa-Ziyyat, S., Guigand, L., Montus, M., Servais, L., et al. (2016). Dystrophin Threshold Level Necessary for Normalization of Neuronal Nitric Oxide Synthase, Inducible Nitric Oxide Synthase, and Ryanodine Receptor-Calcium Release Channel Type 1 Nitrosylation in Golden Retriever Muscular Dystrophy Dystrophinopathy. *Human Gene Therapy* 27, 712–726.
- Goyenvalle, A., and Davies, K.E. (2011). Engineering exon-skipping vectors expressing U7 snRNA constructs for Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Methods Mol. Biol.* 709, 179–196.
- Greco, S., De Simone, M., Colussi, C., Zaccagnini, G., Fasanaro, P., Pescatori, M., Cardani, R., Perbellini, R., Isaia, E., Sale, P., et al. (2009). Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. *FASEB J.* 23, 3335–3346.
- Horak, M., Novak, J., and Bienertova-Vasku, J. (2016). Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development. *Developmental Biology* 410, 1–13.
- Hu, J., Kong, M., Ye, Y., Hong, S., Cheng, L., and Jiang, L. (2014). Serum miR-206 and other muscle-specific microRNAs as non-invasive biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurochem.* 129, 877–883.
- Jeanson-Leh, L., Lameth, J., Krimi, S., Buisset, J., Amor, F., Le Guiner, C., Barthélémy, I., Servais, L., Blot, S., Voit, T., et al. (2014). Serum Profiling Identifies Novel Muscle miRNA and Cardiomyopathy-Related miRNA Biomarkers in Golden Retriever Muscular Dystrophy Dogs and Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *The American Journal of Pathology* 184, 2885–2898.
- Kobayashi, Y.M., Rader, E.P., Crawford, R.W., Iyengar, N.K., Thedens, D.R., Faulkner, J.A., Parikh, S.V., Weiss, R.M., Chamberlain, J.S., Moore, S.A., et al. (2008). Sarcolemma-localized nNOS is required to maintain activity after mild exercise. *Nature* 456, 511–515.
- Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C., and Kunkel, L.M. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50, 509–517.
- Koenig, M., Beggs, A.H., Moyer, M., Scherpf, S., Heindrich, K., Bettecken, T., Meng, G., Müller, C.R., Lindlöf, M., Kaariainen, H., et al. (1989). The molecular basis for Duchenne

versus Becker muscular dystrophy: Correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* 45, 498–506.

Mamchaoui, K., Trollet, C., Bigot, A., Negroni, E., Chaouch, S., Wolff, A., Kandalla, P.K., Marie, S., Di Santo, J., St Guily, J.L., *et al.* (2011). Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skelet Muscle* 1, 34.

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

Monaco, A.P., Bertelson, C.J., Liechti-Gallati, S., Moser, H., and Kunkel, L.M. (1988). An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 2, 90–95.

Nelson, C.E., Hakim, C.H., Ousterout, D.G., Thakore, P.I., Moreb, E.A., Rivera, R.M.C., Madhavan, S., Pan, X., Ran, F.A., Yan, W.X., *et al.* (2016). In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science* 351, 403–407.

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

Percival, J.M., Anderson, K.N.E., Gregorevic, P., Chamberlain, J.S., and Froehner, S.C. (2008). Functional Deficits in nNOS μ -Deficient Skeletal Muscle: Myopathy in nNOS Knockout Mice. *PLoS ONE* 3.

Reilly, S.N., Liu, X., Carnicer, R., Recalde, A., Muszkiewicz, A., Jayaram, R., Carena, M.C., Wijesurendra, R., Stefanini, M., Surdo, N.C., *et al.* (2016). Up-regulation of miR-31 in human atrial fibrillation begets the arrhythmia by depleting Dystrophin and neuronal nitric oxide synthase. *Sci Transl Med* 8, 340ra74.

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. (2012). 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* 1, e39.

Tabebordbar, M., Zhu, K., Cheng, J.K.W., Chew, W.L., Widrick, J.J., Yan, W.X., Maesner, C., Wu, E.Y., Xiao, R., Ran, F.A., *et al.* (2016). In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science* 351, 407–411.

Vignier, N., Amor, F., Fogel, P., Duvallet, A., Poupiot, J., Charrier, S., Arock, M., Montus, M., Nelson, I., Richard, I., *et al.* (2013). Distinctive Serum miRNA Profile in Mouse Models of Striated Muscular Pathologies. *PLOS ONE* 8, e55281.

Wang, Y., Newton, D.C., Robb, G.B., Kau, C.-L., Miller, T.L., Cheung, A.H., Hall, A.V., VanDamme, S., Wilcox, J.N., and Marsden, P.A. (1999). RNA diversity has profound effects on the translation of neuronal nitric oxide synthase. *PNAS* 96, 12150–12155.

Young, C.S., Hicks, M.R., Ermolova, N.V., Nakano, H., Jan, M., Younesi, S., Karumbayaram, S., Kumagai-Cresse, C., Wang, D., Zack, J.A., *et al.* (2016). A single CRISPR-Cas9 deletion strategy that targets the majority of DMD patients restores Dystrophin function in hiPSC-derived muscle cells. *Cell Stem Cell* 18, 533–540.

I.4 Expériences *in vivo*

I.4.1 Matériels et méthodes

Transfection des myoblastes murins sains

Les myoblastes murins sont transfectés, récoltés et analysés comme décrits dans l'article pour les myoblastes humains. Le milieu de prolifération utilisé est un milieu IMDM+20% SVF.

Traitement des animaux

Nous avons conçu l'antagomiR-34c selon la séquence suivante : 5'-mG(*)mC(*)mAmAmUmCmAmGmCmUmAmAmCmUmAmCmAmCmUmG(*)mC(*)mC(*)mU-3'-Chl, où Chl désigne des molécules de cholestérol, * des groupements phosphorothioate, et m, des groupements méthyle. L'antagomiR-34c a été produit selon la purification *In vivo* HPLC (GE DharmaconTM). L'antagomiR-34c déshydraté a été resuspendu dans une solution saline (PBS pour *Phosphate Buffered Saline*).

Des muscles *Tibialis Anterior* (TA) de souris *mdx* de 5 semaines ont été injectés avec 40 µl de PBS ou d'antagomiR-34c (environ 50 nmol). 4 jours après, les TA ont été injectés de nouveau avec 50 µl de PBS ou d'antagomiR-34c (environ 40 nmol). 4 jours après, les souris sont sacrifiées et les muscles sont collectés, congelés instantanément dans l'isopentane refroidi à l'azote liquide et stockés à -80°C.

Détection de nNOS par Western-blot, quantification des miARNs et de l'ARNm nNOS

Les coupes de muscles sont effectuées sur le Cryostat Leica CM3050S, à -22°C. Des coupes de 10 µm sont effectuées pour les expériences d'immunofluorescence et 40 coupes de 10µm sont réalisées pour les extractions protéiques et nucléiques. Les protocoles d'immunofluorescence, de Western-blot, d'extraction d'ARN et de quantification des miARNs sont les mêmes que ceux décrits dans l'article. La quantification de l'expression de l'ARNm nNOS a été effectuée selon le protocole suivant (Thermofisher) : 210 ng d'ARN sont dilués dans 11,5 µl d'eau. L'ARN est dénaturé par incubation 5 min à 65°C puis il est ajouté 1 µl de random primers 300ng/µl, 1 µl de dNTP 10 mM, 2 µl de DTT, 4 µl de First-strand Buffer 5X et 0,25 µl de Superscript II. Les échantillons sont ensuite incubés 10 min à 25°C, 50 min à 42°C, 5 min à 95°C puis stockés à 4°C. L'ADNc obtenu est ensuite analysé par PCR quantitative selon le protocole suivant : 10µl de Power Sybr Green (Thermofisher), 0,4 µl d'amorces F : 5'-AAGGAGCAAGGAGGCCATAT-3', 0,4 µl d'amorces R : 5'-ATATGTTCTGAGGGTGACCCC-3', qsp 15 µl d'H₂O, 5 µl d'ADNc dilué au 1/3. La

quantification est effectuée par analyse en temps réel à l'aide du thermocycleur Step One Plus (Thermofisher).

1.4.2 Résultats

Validation du modèle murin

Afin de confirmer les résultats obtenus *in vitro*, nous avons réalisé des expériences permettant la modulation de l'expression du miR-34c *in vivo* dans des muscles *Tibialis Anterior* (TA) de souris *mdx*. Nous avons dans un premier temps montré que chez ces souris, l'expression du miR-34c est augmentée (Figure 23a) et l'expression de nNOS diminuée. Cette diminution est retrouvée au niveau transcriptionnel puisqu'on observe une diminution du transcrit nNOS d'environ 60% par RT-qPCR (Figure 23b) et au niveau protéique avec une diminution de nNOS d'environ 60% observée en Western-blot. Ce dernier résultat n'est cependant pas significatif car cette expérience a été effectuée sur une seule souris contrôle et 4 souris *mdx* (Figure 23c). Néanmoins, la diminution de la protéine nNOS est confirmée par les expériences d'immunohistochimie qui montrent une nette diminution du marquage dans les souris *mdx* par rapport aux souris contrôles (Figure 23d). Afin de valider l'effet du miR-34c sur nNOS dans le modèle murin, nous avons réalisé une analyse *in silico* des cibles potentielles du miR-34c dans le 3'UTR de *Nos1*, le gène murin codant nNOS. Nos données montrent la présence de cinq séquences potentielles cibles de ce miARN (Figure 23e). Le miR-34c a alors été surexprimé dans des cellules de souris saines afin d'évaluer son effet sur l'expression de nNOS dans un contexte murin (Figure 23e). L'analyse protéique de nNOS par Western-blot montre une diminution de 86% de l'expression de nNOS dans les cellules transfectées avec le miR-34c par rapport au contrôle (Figure 23f).

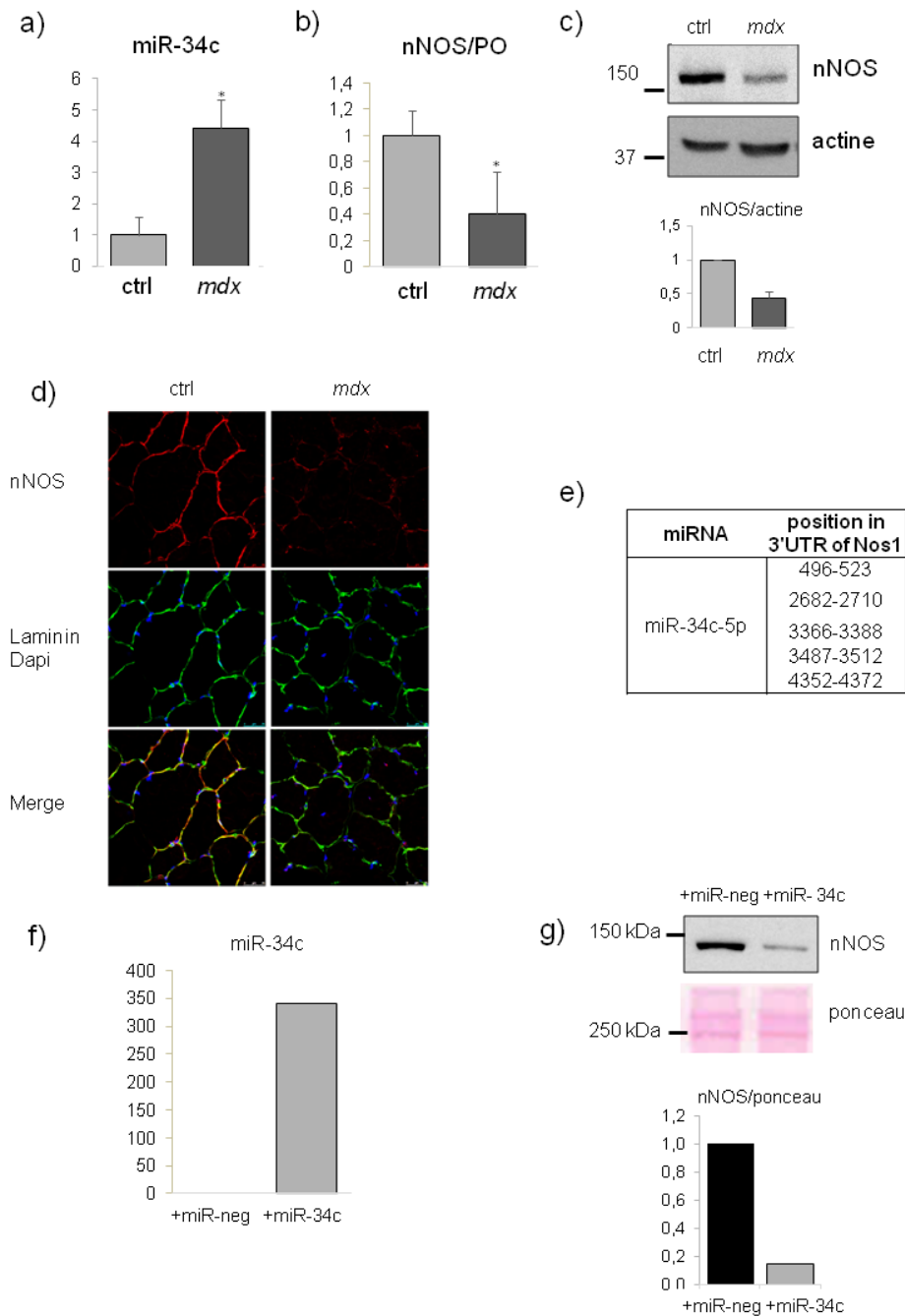


Figure 23: Expression du miR-34c et de nNOS chez la souris et modulation du miR-34c dans un modèle cellulaire murin. (a) Expression du miR-34c dans les Tibialis Anterior (TA) de souris contrôles (ctrl, n=4) et de souris *mdx* (n=5). Les graphes indiquent la quantification relative de l'expression du miR-34c par rapport au normalisateur miR-30b. (b) Expression transcriptionnelle de nNOS dans les TA de souris contrôles (ctrl, n=5) et de souris *mdx* (n=5). Les graphes indiquent la quantification relative de l'expression de nNOS par rapport au normalisateur P0. (c) Western-blot dirigé contre nNOS dans des TA de souris contrôles (n=1) et de souris *mdx* (n=4). Le graphe représente la quantification relative de l'expression de nNOS normalisée sur l'expression de l'actine. (d) Coupes de TA de souris contrôles (ctrl) ou de souris *mdx* immunomarquées avec un anticorps anti-nNOS (en rouge) et anti-laminine (en vert). Les noyaux sont marqués au DAPI (en bleu). Les images sont prises en microscopie confocale, objectif x 40. (e) Sites de liaison possibles du miR-34c-5p sur *Nos1* prédits *in silico*. (f) Expression du miR-34c transfecté dans des myoblastes murins sains avec un miARN non spécifique (+miR-neg) et le miR-34c (+miR-34c). Les graphes indiquent la quantification relative de l'expression du miR-34c par rapport au normalisateur U6 (g) Western-blot dirigé contre nNOS dans des myoblastes murins sains avec un miARN non spécifique (+miR-neg) et le miR-34c (+miR-34c). Le graphe représente la quantification relative de l'expression de nNOS normalisée sur le ponceau dans les cellules transfectées avec le miARN non-spécifique.

Inhibition du miR-34c *in vivo*

Les résultats obtenus sur les myoblastes humains et dans les expériences préliminaires sur le modèle murin nous ont amené à effectuer des tests *in vivo*. Un antagomiR-34c a été injecté en intramusculaire, dans le TA de 4 souris *mdx*. L'évaluation de l'expression du miR-34c a montré une diminution drastique dans les pattes injectées avec l'antagomiR-34c, comparées aux pattes injectées avec du PBS (93, 95, 95 et 98% de diminution) (Figure 24a). L'expression transcriptionnelle de *Nos1* a ensuite été évaluée par RT-qPCR (Figure 24b). Les résultats sont très hétérogènes. Ainsi, la souris *mdx* non-injectée présente une différence d'un facteur 3 entre les 2 TA, le muscle de la souris *mdx* 1 injecté avec l'antagomiR-34c ne présente pas de différence avec le TA contrôle, les TA injectés avec l'antagomiR-34c des souris *mdx* 2 et 3 montrent une augmentation d'un facteur 1,5 et 2 par rapport au TA contrôle tandis que le TA injecté avec l'antagomiR-34c de la souris *mdx* 4 montre une diminution d'un facteur 2. Ces hétérogénéités se retrouvent également au niveau protéique, comme déterminé par Western-blot, puisqu'on observe, dans les TA injectés avec l'antagomiR-34c des souris *mdx* 1 et 2 une augmentation de nNOS de 1,7 et 1,9 respectivement, pas de différence pour la souris 3 et une légère diminution d'un facteur 1,2 dans le TA injecté avec l'antagomiR-34c pour la souris *mdx* 4 (Figure 24c). Cette hétérogénéité ne nous permet pas de porter de conclusions et l'augmentation du nombre de souris serait nécessaire pour apporter une réponse précise sur l'effet d'une inhibition du miR-34c *in vivo*, dans le modèle murin.

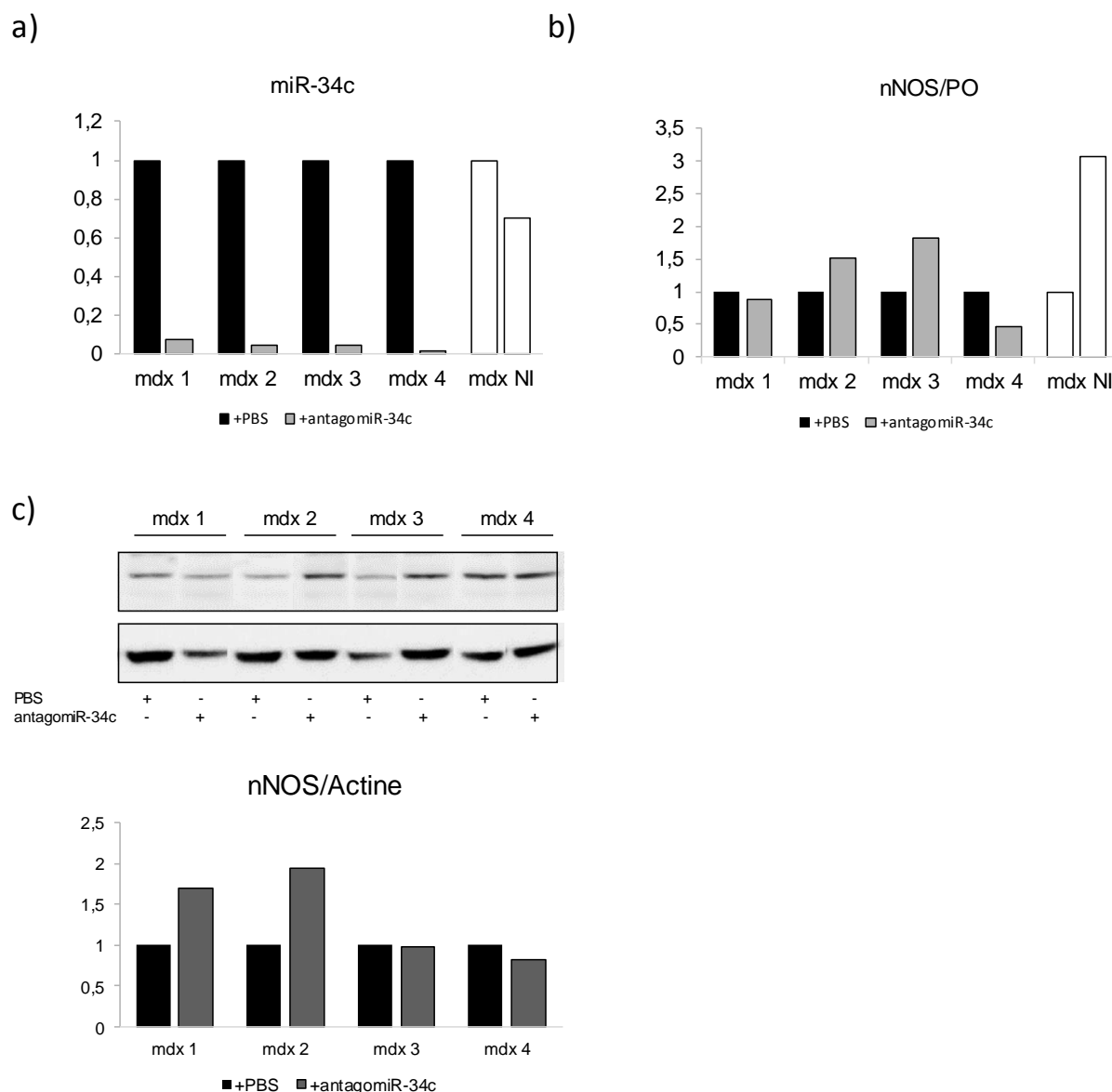


Figure 24 : Inhibition du miR-34c dans des TA de souris mdx. (a) Expression du miR-34c dans des *Tibialis anterior* (TA) de souris *mdx* injectés avec du PBS (contrôle, en noir), l’antagomiR-34c (en gris) ou non-injectés (en blanc). Les graphes indiquent la quantification relative de l’expression du miR-34c par rapport au normalisateur miR-30b et normalisée sur l’expression du miR-34c dans le TA contrôle pour chaque souris. (b) Expression de l’ARNm nNOS dans des TA de souris *mdx* injectés avec du PBS (contrôle, en noir), l’antagomiR-34c (en gris) ou non-injectés (en blanc). Les graphes indiquent la quantification relative de l’expression de l’ARNm nNOS par rapport au normalisateur PO et normalisée sur l’expression de nNOS dans le TA contrôle pour chaque souris. (c) Western-blot réalisé à partir de lysats protéiques de TA de souris *mdx* injectés avec du PBS (contrôle, en noir) ou l’antagomiR-34c (en gris) révélé avec un anticorps anti-nNOS. Le graphe représente la quantification relative de l’expression de nNOS par rapport à l’actine, normalisée sur l’expression de nNOS dans le TA contrôle pour chaque souris.

I.5 Discussion

Dans cette étude nous avons d'abord sélectionné quatre miARNs : miR-31-5p, miR-708-5p, miR-34c-5p et miR-212-3p car ils étaient surexprimés chez les patients BMDdel45-55 par rapports aux sujets sains ou chez les patients avec un phénotype sévère par rapport aux patients avec un phénotype plus modéré. De plus, nous avons déterminé *in silico* que ces miARNs pouvaient potentiellement cibler des séquences au niveau du 3'UTR de *NOS1*. Une étude avec un gène rapporteur luciférase a validé que les miR-31, -708 et -34c ciblaient des séquences dans le 3'UTR de *NOS1*.

Le miR-31 a été décrit comme surexprimé dans des souris *mdx* et dans des biopsies de patients DMD (Greco *et al.* 2009, Cacchiarelli *et al.* 2011, Roberts *et al.* 2012), ce que nous retrouvons dans les biopsies de patients BMDdel45-55, dans les myoblastes DMDdel45-52 et dans les muscles de souris *mdx* (résultat non présenté ici). L'équipe de Cacchiarelli ne décrivait en revanche pas d'augmentation de l'expression du miR-31 dans des biopsies de patients BMD mais aucune information n'était donnée quant à la mutation du gène *DMD* présentée par ces patients (Cacchiarelli *et al.* 2011). Nous pouvons cependant supposer que cette mutation donne un phénotype peu sévère puisque nous retrouvons dans nos résultats de RT-qPCR individuelle une expression plus importante du miR-31 chez les patients avec un phénotype sévère par rapport aux patients avec un phénotype plus modéré (Figure 2c de l'article). Ces données sont concordantes avec les résultats de Cacchiarelli *et al.* qui montrent également que les niveaux élevés de miR-31 dans des muscles DMD sont en partie dus à une régénération intensive, qui impliquent les cellules-satellites, régénération qui est également plus importante chez les patients BMD avec un phénotype sévère, au vu de l'histologie des coupes musculaires (Gentil *et al.* 2012).

Parmi les cibles du miR-31 dans le muscle, plusieurs équipes ont montré un effet de ce miARN sur le gène *DMD* (Cacchiarelli *et al.* 2011 ; Fiorillo *et al.* 2015 ; Reilly *et al.* 2016). Il est à noter qu'une diminution de l'expression de la Dystrophine a été retrouvée chez les patients BMDdel45-55 (Gentil *et al.* 2012), une corrélation entre l'expression protéique de la Dystrophine effectuée dans cet article et l'expression des miARNs dans nos analyses de TLDA met en évidence une bonne proportionnalité entre la Dystrophine et l'expression du miR-31. Cependant cette analyse n'a pu être effectuée que sur 5 patients (résultat non présenté ici). Enfin, une équipe a récemment montré que le miR-31 ciblait nNOS par dégradation de son ARNm, dans des cellules cardiaques atriales de patients atteints de fibrillation auriculaire (Reilly *et al.* 2016). De plus, cette étude montre que la diminution de l'expression de

Dystrophine due au miR-31, entraînerait une délocalisation de nNOS et son instabilité, diminuant ainsi son activité. Nous retrouvons le même résultat que cette équipe dans le contexte artificiel du clonage d'un plasmide 3'UTR-*NOS1* en aval de la luciférase dans des cellules HEK293T. En effet, nous observons une diminution de l'activité luciférase lorsque le miR-31 est transfecté avec la partie 3 du 3'UTR, indiquant que ce miARN ciblerait *NOS1* au niveau d'une région similaire à celle montrée par Reilly *et al.* En revanche, nous ne retrouvons pas d'effet significatif du miR-31 sur nNOS lorsque nous le surexprimons dans les myoblastes humains contrôles. Dans l'étude de Reilly *et al.* la surexpression du miR-31 entraîne une augmentation de l'expression du miR-31 d'un facteur 2.10^4 par rapport à l'expression basale du miR-31 alors que dans notre étude nous observons une augmentation d'un facteur 4.10^3 (Figure 5a de l'article). Nous remarquons une légère baisse du signal nNOS en immunofluorescence et en Western-blot mais il est possible que notre surexpression n'ait pas été suffisante pour visualiser une diminution de nNOS significative. Cependant, il nous était difficile d'augmenter davantage la concentration des miARNs du fait de l'effet délétère de la transfection sur nos cellules. Enfin, la complexité de la régulation par les ARN non-codants nous amène également à envisager un système de modulation différent en fonction des tissus étudiés. En effet, l'étude de Reilly *et al.* a été effectuée sur des myocytes provenant d'atrium de patients atteints de fibrillation atriale, traités ou non, par des pharmacologies restauratrices du rythme sinusoïdal.

Nos résultats montrent que les miR-708 et -34c ont un effet sur l'expression de nNOS dans des myoblastes humains, puisqu'une surexpression de ces miARNs dans des myoblastes contrôles mène à une inhibition de l'expression protéique de nNOS tandis qu'une inhibition de l'expression de ces miARNs dans des myoblastes DMDdel45-52 mène à une augmentation protéique de nNOS. Afin de valider ces données *in vivo*, nous avons étudié l'effet de l'inhibition du miR-34c sur l'expression de la nNOS en utilisant un antagomiR-34c injecté en intramusculaire, dans le *Tibialis Anterior* de souris *mdx*. Les données obtenues *in vivo* sont trop hétérogènes pour pouvoir conclure à un effet du miR-34c, malgré une diminution importante de l'expression de ce miARN obtenue par injection intramusculaire d'un antagomiR-34c. Nous avons choisi d'inhiber ce miARN car il est décrit dans la littérature comme surexprimé chez les souris *mdx* et chez les patients DMD (Roberts *et al.* 2012 ; Greco *et al.* 2009), ce que nous avons retrouvé dans les biopsies de patients BMDdel45-55 (Figure 2c de l'article), dans les myoblastes humains DMDdel45-52 (Figure 4a de l'article) et dans les TA de souris *mdx* (Figure 23a). L'étude de Greco *et al.* montre également que le miR-34c est surexprimé dans les fibres en régénération dans un modèle d'ischémie ainsi que dans des

myoblastes en différenciation (Greco *et al.* 2009), suggérant un rôle de ce miARN dans la régénération, hypothèse corroborée par une autre équipe qui montre que le miR-34c est surexprimé dans des myoblastes murins en différenciation ainsi que dans des muscles de souris en régénération (Wang *et al.* 2017). Le miR-34c inhiberait la prolifération des myoblastes en ciblant le gène *YY1*, un facteur de transcription impliqué dans le cycle cellulaire. Par ailleurs, une autre équipe a montré que le miR-34c inhibe la prolifération des cellules satellites chez le porc, entraînant ces cellules sur la voie de la différenciation (Hou *et al.* 2017). Le miR-34c inhiberait la voie de signalisation Notch1 qui participe au maintien de la quiescence des cellules satellites. Par ailleurs, Notch1 régulerait l'expression de ce miARN.

L'expression du miR-708 dans le muscle est très peu décrite dans la littérature. Cependant, une équipe a montré que ce miARN était surexprimé dans des cellules musculaires cardiaques de rongeurs nouveau-nés et que sa surexpression entraîne une différenciation des progéniteurs cardiaques en cardiomyocytes (Deng *et al.* 2016). Le miR-708 permettrait la régénération du myocarde en inhibant l'expression de *MAPK14*, un gène participant au cycle cellulaire. Par ailleurs, l'expression du miR-708 a été décrite comme étant inhibée dans des myoblastes murins atrophiés par la dexaméthasone, suggérant une implication de ce miARN dans le développement musculaire (Shen *et al.* 2013). Dans notre étude, nous avons montré que le miR-708 avait également un rôle dans la régulation de nNOS dans un contexte dystrophique. La prochaine étape sera d'évaluer son rôle *in vivo*.

Il est intéressant de noter que l'isoforme de nNOS détectée par Western-blot dans les myoblastes semble être l'isoforme β puisqu'elle apparaît à une taille d'environ 140 kDa. Par ailleurs, la modulation des miARNs paraît avoir un impact sur la localisation de la nNOS détectée par immunofluorescence. Ainsi dans les myoblastes humains contrôles, les surexpressions des miR-708 et -34c semblent induire une diminution du marquage de la protéine nNOS dans le noyau (Figure 5b de l'article). A l'inverse, une inhibition de l'expression de ces miARNs dans les myoblastes DMDdel45-52 induit une augmentation de la nNOS dans le noyau (Figure 6b de l'article). L'analyse de nNOS par Western-blot dans les fractions nucléaires et cytoplasmiques des myoblastes contrôles et DMD montre la présence d'une isoforme de 140 kDa dans le cytoplasme et dans le noyau et la présence d'une isoforme de 160 kDa dans la fraction nucléaire seulement (figure supplémentaire S4 de l'article). Par ailleurs, aucune isoforme de nNOS de 140 kDa n'est actuellement décrite comme exprimée dans le noyau. Une équipe a montré que le domaine PDZ était nécessaire à l'expression de nNOS dans le noyau (Aquilano *et al.* 2014). Ce domaine est décrit seulement dans les

isoformes α et μ , de 160 kDa et 165 kDa respectivement, ce qui ne correspond pas à nos observations. Par ailleurs, nous ne sommes pas parvenus à détecter l'ARNm de nNOS par PCR quantitative, malgré des amorces situées dans différentes parties de la séquence de *NOS1* décrite dans la base de données Ensembl.org (ENSG00000089250). Cette base de données n'indique d'ailleurs aucune information de séquence pour le transcrit β . Ces résultats, ainsi que l'expression transcriptionnelle complexe de nNOS suggèrent que l'isoforme de nNOS exprimée dans les myoblastes et régulée par les miR-34c et -708 n'a pas encore été décrite de façon précise et que les mécanismes de transcription de ce gène restent encore à approfondir.

En conclusion, ce travail nous a permis d'identifier deux miARNs, le miR-708-5p et le miR-34c-5p qui sont sur-exprimés dans le muscle murin et humain dans un contexte dystrophique. Nous avons déterminé que ces deux miARNs peuvent moduler l'expression de la protéine nNOS qui est impliquée dans de nombreux processus liés à la pathophysiologie des dystrophinopathies.

II. Identification de différences de profils de lncARNs chez les patients BMDdel45-55.

II.1 Hypothèse

Les introns 44 et 55 bordent la délétion exonique 45-55 des patients BMDdel45-55. Une équipe a caractérisé six lncARNs dans le gène *DMD* (Bovolenta *et al.* 2012). Certains de ces lncARNs ont été identifiés dans les introns 44 et 55 et il a été démontré qu'ils permettaient de réguler l'expression de la Dystrophine (Bovolenta *et al.* 2012) (Figure 24a). Sachant que les points de cassure génomique précis, respectivement dans les introns 44 et 55 des patients BMDdel45-55 ne sont pas identifiés, nous avons émis l'hypothèse que certains pouvaient impacter l'expression de lncARNs présents dans ces introns. Ainsi, les patients présenteraient des profils de lncARNs différents pouvant avoir un lien avec la sévérité différente des phénotypes observée.

Afin d'apporter un début de réponse à cette hypothèse nous avons évalué si les lncARNs décrits dans les introns 44 et 55 étaient présents au niveau génomique dans une cohorte de patients BMDdel45-55.

II.2 Matériels et méthodes

ADN des patients BMDdel45-55

L'ADN de 10 patients BMDdel45-55 (cohorte différente de l'étude de Gentil *et al.*) a été fourni, après consentement des patients, par le Dr France Leturq, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Groupe hospitalier de Cochin, Paris.

Détection des lncARNs dans les introns 44 et 55 du gène *DMD*

La détection des lncARNs ncINT44s2, ncINT55s et ncINT55as a été effectuée par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) semi-quantitative. 75 ng d'ADN sont amplifiés selon le protocole suivant : 12,5 µl de PCR MasterMix 2X (Promega), 1 µl d'amorces sens et antisens (séquences dans le tableau 1) et 10,5 µl d'ADN selon le programme d'amplification suivant : 95°C 2min ; 35 cycles 95°C 30s, T_m 30s, 72°C 30s ; 72°C 5min. Les 5 premiers cycles ont une température d'hybridation (T_m) progressive (de T_m-5° à T_m).

Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées dans l'étude des lncARNs, température d'hybridation utilisée (Tm) et taille attendue des amplicons

Nom	Séquence	Tm	Taille de l'amplicon
ncINT44s2_F	ACCAGGAGCTCTGCTTGCAT	55°C	71 pb
ncINT44s2_R	TTGTGCATGATAATGTGCCTCAA		
ncINT55s_F	TGATAACTTTCATGCCATTAACATAG	50°C	68 pb
ncINT55s_R	AACAGGACACAAATTCAGCACTTC		
ncINT55s_F2	AGCTCTGTGAAGAGACGGGAAG	55°C	836 pb
ncINT55s_R2	CTGGAGAAAGGAGCCAGTGA		
ncINT55as_F	CATTAGAGCAAGAGATACAGGCATT	55°C	761 pb
ncINT55as_R	CCAGCATTTTGCTTCGGAGG		
Albumine F	CTGTCATCTCTTGTGGGCTGT	60°C	137 pb
Albumine R	CTCATGGGAGCTGCTGGTTC		

Séquençage du génome entier d'un patient BMDdel45-55

Le séquençage du génome entier (WGS pour *Whole Genome Sequencing*) du patient BMD11 a été effectué en collaboration avec le Centre National de Génotypage, avec une profondeur 40X. Les coupures précises de la délétion dans le gène *DMD* ont été confirmées par PCR et séquençage (GATC Biotech) selon les amorces int55F : CCTGGCTGGCCCATCAATTT et int44R : AGCAGATGGTGGGATTGGTG selon le protocole suivant : 25 µl master mix Phusion, 1 µl primers int55F et int44R, 18 µl H₂O, 5 µl ADN. Le produit de PCR obtenu est mis à migrer sur gel d'agarose 1% et purifié avec le kit NucleoSpin gel and PCR clean up de Macherey Nagel puis séquencé avec les mêmes primers. Les positions de la délétion sont indiquées à partir du génome de référence GRCh37.

Alignement des séquences

L'alignement de la séquence obtenue par WGS pour le patient BMD11 et les séquences des lncARNs décrites par Bovolenta *et al.* (Bovolenta *et al.* 2012) ont été réalisées avec le logiciel en ligne Standard Nucleotid Blast – NCBI.

II.3 Résultats

Détection des lncARNs à partir de l'ADN de patients BMDdel45-55

Afin de déterminer s'il existe des profils de lncARNs différents chez les patients BMDdel45-55, nous avons effectué des PCR semi-quantitatives ciblant le ncINT44s2, situé dans l'intron 44 et les ncINT55s et ncINT55as situés dans l'intron 55 (Figure 25a), à partir de l'ADN de ces patients.

Les résultats montrent la présence de la séquence ciblée par les amorces ncINT44s2 chez tous les patients (Figure 25b). En revanche, les séquences ciblées par les 2 couples d'amorces ncINT55s sont retrouvées seulement chez les patients BMD3, 5, 8 et 10. Dans le cas du patient BMD6, seul le couple d'amorces 1 permet de détecter une séquence pour le ncINT55s. La séquence ciblée par les amorces ncINT55as est détectée chez les patients BMD3, 5 et 10 et faiblement chez le patient BMD4.

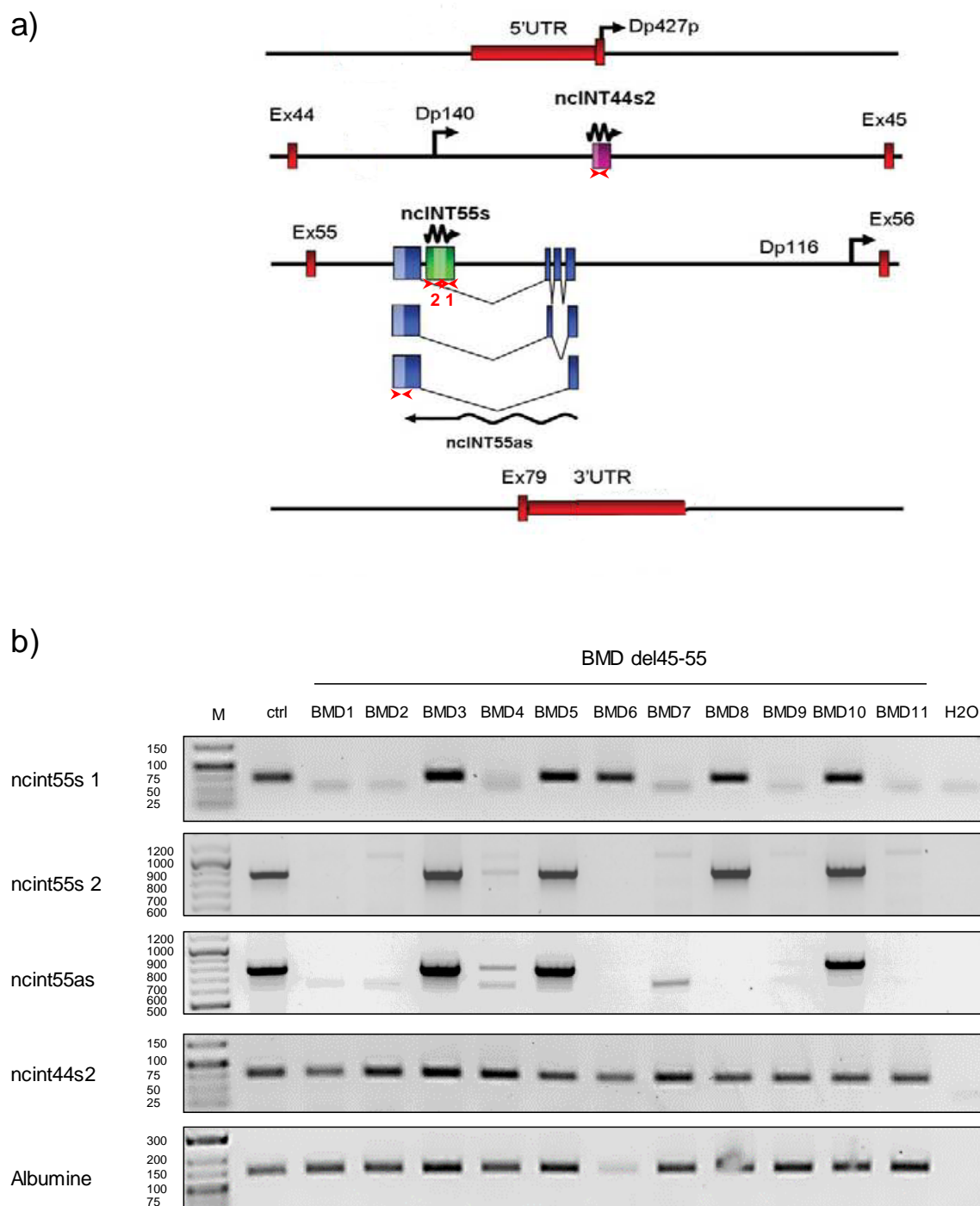


Figure 25 : Détection des lncARNs décrits dans les introns 44 et 55 à partir de l'ADN de patients BMDdel45-55. a) Représentation schématique des lncARNs dans les introns 44 et 55. Les amorces utilisées sont indiquées par des têtes de flèches rouges. L'orientation de la transcription des lncARNs est indiquée par les flèches en zigzag. Leur position par rapport aux exons du gène *DMD* (rectangles verticaux rouges) ou aux extrémités non traduites (UTR, rectangles horizontaux rouges) et les promoteurs des isoformes (flèches droites) est montrée. Les couleurs plus claires dans les transcrits indiquent des sites d'initiation ou de polyadénylation alternatifs. L'épissage alternatif du ncINT44as donne 3 transcrits qui sont représentés (*adaptée de Bovolenta et al. Plos One, 2012*). **b)** PCR semi-quantitative ciblant ncINT55s selon 2 couples d'amorces 1 et 2, ncINT55as, ncINT44s2 et albumine comme contrôle de charge. M : marqueur de taille.

Séquençage du patient BMD11

Dans le cadre d'un projet de WGS de cette cohorte de patients (*cf.* Chapitre 3), l'ADN du patient BMD11 a été utilisé pour une étude pilote de faisabilité. Les résultats montrent une bonne qualité de séquençage, et prédisent les bornes de la délétion à 3 bases près. Afin de vérifier la séquence de ce patient au niveau des bornes de la délétion, des amorces ont été déterminées de part et d'autre de la mutation prédite par le séquençage. L'ADN a été amplifié par PCR puis séquencé localement. Les résultats confirment la séquence obtenue par WGS et nous permettent de déduire le point de cassure de la délétion à 3 bases près du fait de la séquence commune sur 2 bases des séquences des 2 introns. (Figure 26).

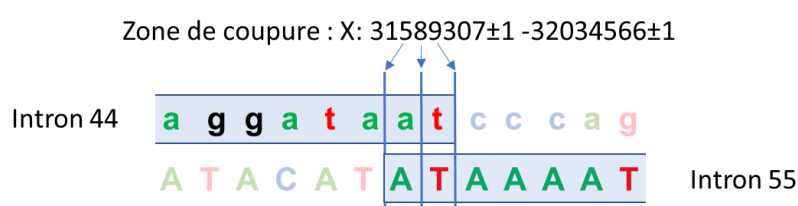


Figure 26 : Bornes de la délétion dans le gène *DMD* du patient BMD11. La séquence effective du patient est surlignée en bleu, la séquence attendue chez un sujet sain est en lettres claires, la séquence de l'intron 44 est en lettres minuscules, la séquence de l'intron 55 est en lettres majuscules. Les traits verticaux bleus indiquent les zones possibles de coupure de l'ADN, les positions sont indiquées à partir du génome de référence GRCh37.

Un alignement de la séquence obtenue pour le patient BMD par WGS et les séquences des lncARNs décrites par Bovolenta *et al.* (2012) confirme l'absence des ncINT55s et ncINT55as chez le patient BMD11 et la présence du ncINT44s2.

II.4 Discussion

Cette étude préliminaire effectuée sur de l'ADN de patients BMDdel45-55 nous a permis de définir des profils génomiques de lncARNs différents, dans l'intron 55, en fonction des patients. Ces lncARNs ciblant le gène *DMD*, une étude de l'expression de la Dystrophine chez ces patients serait particulièrement intéressante, afin de définir des corrélations entre l'absence de ces lncARNs et l'expression de la Dystrophine. Cette étude n'a pas pu être effectuée dans ce travail, du fait d'un manque de matériel biologique nous permettant d'analyser l'expression protéique et transcriptionnelle de la Dystrophine. Pour la même raison, l'étude transcriptionnelle des lncARNs n'a pas pu être effectuée. Cependant, pour les patients dont le lncARN n'est pas détecté au niveau génomique, l'expression transcriptionnelle est selon toute vraisemblance nulle. En revanche, l'analyse des profils

transcriptionnels de ces lncARNs pour les patients chez lesquels un signal au niveau de l'ADN a été détecté, permettrait d'approfondir les différents profils d'expression observés chez les patients BMDdel45-55. Les tableaux cliniques des patients sont en cours d'acquisition et permettront d'effectuer une corrélation préliminaire entre le phénotype et la présence ou non des lncARNs.

Ce travail nous permet de visualiser l'importance de l'identification précise des points de cassure introniques des délétions chez ces patients, qui peuvent avoir un impact sur des profils d'ARNs non codants, décrits ou non. Les introns de part et d'autre de la délétion des exons 45 à 55 ont en effet une taille conséquente (près de 250 000 nucléotides pour l'intron 44 et plus de 120 000 nucléotides pour l'intron 55), laissant suggérer la présence d'ARN non-codants ou de cibles d'ARN non-codants pas encore identifiés.

III. Hypothèse structurale DMD/nNOS

III.1 Hypothèse

Les patients BMD présentent des phénotypes différents suivant la mutation dans le gène *DMD*. Une équipe a montré que ces différences de phénotypes étaient associées à des différences de structure de la Dystrophine (Nicolas *et al.* 2015). Ainsi les patients BMDdel45-47 présentent un phénotype plus sévère que les patients BMDdel45-51 par exemple. La délétion des exons 45 à 47 (del45-47) touche le site de liaison à la nNOS. En effet, ce site se trouve normalement au niveau des répétitions de type spectrine 16 et 17 de la Dystrophine, codées par les exons 42 à 46. Dans ce cadre, cette équipe a cherché à évaluer la structure de l'interaction Dystrophine/nNOS en présence ou non de la mutation del45-47, et de la comparer à l'expression et la localisation de nNOS d'une cohorte de patients BMDdel45-47.

III.2 Résumé

Dans le but de comprendre la structure et les conséquences de la délétion des exons 45 à 47, qui entraîne un phénotype BMD sévère, la structure en trois dimensions de la zone mutée a été obtenue par analyse aux rayons X (SAXS pour *Small Angle X-ray Scattering*) et modélisation moléculaire. Cette structure a été comparée à celle obtenue pour la protéine native. Il apparaît que la structure de la Dystrophine est profondément modifiée dans le cas de la mutation del45-47. De plus, malgré la conservation d'une grande partie de la séquence de liaison à la nNOS, la désorganisation de la structure des répétitions 16 et 17 de la Dystrophine empêche la modélisation de la formation du complexe Dystrophine/nNOS chez ces patients, résultat qui est confirmé par la perte massive de la localisation sarcolemmale observée par immunofluorescence dans des coupes de biopsies musculaires chez des patients BMDdel45-47. On observe également une diminution massive de l'expression protéique de nNOS.

Ces résultats pourraient expliquer, au moins en partie, les différences de phénotypes observées en fonction des mutations chez les patients BMD.

III.3 Article

Title

Unexpected topological complexity in dystrophin's central domain explains the severity and outcomes of in-frame deletions

Running title

Structural effects of in-frame deletion of the DMD gene

Classification: Biological Sciences: Medical Genetics, Hematology and Oncology; Biophysics and Computational Biology

Authors

Delalande Olivier^{1,2*}, Molza Anne-Elisabeth^{1,2}, Raphael Dos Santos Morais^{1,2,3,4}, Angélique Chéron^{1,2}, Émeline Pollet^{1,2}, Céline Raguènes-Nicol^{1,2}, Christophe Tascon^{1,2}, Emmanuel Giudice^{1,2}, Marine Guilbaud⁵, Aurélie Nicolas^{1,2}, Arnaud Bondon^{1,6}, France Leturcq^{5,7}, Nicolas Férey⁸, Marc Baaden⁹, Javier Perez³, Pierre Roblin^{3,10}, France Piétri-Rouxel⁵, Jean-François Hubert^{1,2}, Mirjam Czjzek^{11,12} and Elisabeth Le Rumeur^{1,2}

Affiliations

¹Université de Rennes 1, 35043 Rennes, France

²CNRS UMR 6290, Institut de Génétique et Développement de Rennes, 35043 Rennes, France

³Synchrotron SOLEIL, 91190 Saint Aubin, France

⁴Laboratoire Léon-Brillouin, UMR 12 CEA-CNRS, Université Paris-Saclay, CEA-Saclay, Gif-sur-Yvette CEDEX F-91191, France

⁵Sorbonne Universités UPMC - INSERM - UMRS 974 - CNRS FRE 3617, Institut de Myologie, 75013 Paris, France

⁶CNRS 6226, Institut des Sciences Chimiques de Rennes, PRISM, 350043 Rennes, France

⁷AP-HP, Groupe Hospitalier Cochin-Broca-Hôtel Dieu, Laboratoire de biochimie et génétique moléculaire, 75014 Paris, France

⁸CNRS UPR3251, Université Paris XI, 91403 Orsay Cedex, France

⁹CNRS UPR9080, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 75005 Paris, France

¹⁰INRA-Biopolymères, Interaction et Assemblages, 44000 Nantes, France

¹¹Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, 75006 Paris, France

¹²CNRS UMR 8227, Integrative Biology of Marine Models, 29688 Roscoff cedex, France

Corresponding author

Olivier Delalande

Institut de Génétique et Développement de Rennes

Faculté de Pharmacie, 35043 Rennes Cedex, France

Phone number: (+33)(0)2 23 23 30 07

Short title: Structural dissection of the dystrophin central domain

OD, JFH, MC and ELR conceived and coordinated the study and wrote the paper. OD, AEM, EP, EG and AN designed, performed and analyzed the molecular simulations. OD, NF and MB designed the interactive simulation tools. AC, CRN, CT, JFH and ELR designed, performed and analyzed the protein fragment samples for SAXS experiments. OD, RDSM, JP, PR, JFH, MC and ELR designed, performed and analyzed the SAXS experiments. AB designed, performed and analyzed the NMR experiments. MG, FL and FPR designed, performed and analyzed the BMD patients cell experiments. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

Abstract

Dystrophin, encoded by the *DMD* gene, is critical for maintaining plasma membrane integrity during muscle contraction events. Mutations in the *DMD* gene disrupting the reading frame prevent dystrophin production and result in the high severe Duchenne muscular dystrophy (DMD); in-frame internal deletions allow production of partly functional internally deleted dystrophin and result in the less severe Becker muscular dystrophy (BMD). Many known BMD deletions occur in dystrophin's central domain, generally considered to be a monotonous rod-shaped domain based on the knowledge of spectrin-family proteins. However, effects caused by these deletions, ranging from asymptomatic to severe BMD, argue against the central domain serving only as a featureless scaffold. We undertook structural studies combining small-angle X-ray scattering and molecular modeling in an effort to uncover the structure of the central domain as dystrophin has been refractory to characterization. We show that this domain appears to be a tortuous and complex filament that is profoundly disorganized by the most severe BMD deletion (loss of exon 45-47). Despite the preservation of large parts of the binding site for neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in this deletion, computational approaches failed to recreate the association of dystrophin with nNOS. This observation is in agreement with a strong decrease of nNOS immunolocalization in muscle biopsies, a parameter related to the severity of BMD phenotypes. The structural description of the whole dystrophin central domain we present here is a first necessary step to improve the design of microdystrophin constructs in the goal of a successful gene therapy for DMD.

Key words: Dystrophin central domain; Becker muscular dystrophy; neuronal Nitric Oxide Synthase; Small angle X-ray scattering; multi resolution modeling

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Introduction

Mutations of the dystrophin *DMD* gene are the cause of two progressive muscle diseases of variable severity, Duchenne and Becker muscular dystrophies (DMD and BMD)(1). Dystrophin consists of a N-terminal actin-binding domain (ABD1), a central domain with 24 spectrin-like repeats interspaced by four hinge regions (2) and a cysteine-rich domain interacting with β -dystroglycan constituting the basis of the dystrophin-glycoprotein complex (DGC)(3, 4) and a C-terminal domain. According to the Monaco rule (5), DMD is mostly due to out-of-frame mutations in the *DMD* gene that result in a complete loss of the protein and a severe phenotype, while in-frame mutations of the *DMD* gene are mainly associated with BMD where modified dystrophin is produced resulting in reputed less severe phenotypes. Most BMD mutations are in-frame genomic deletions that lead to proteins lacking part of the central domain repeats (6, 7) and constitute the pattern for therapeutic strategies aiming to transform DMD patients into BMD patients (8) either by exon skipping, by injection of micro-dystrophins (9-12) or by CRISPR/cas9 gene edition (13, 14). Indeed, the central domain has been until now considered as a monotonous rod-shaped domain which could be internally truncated without dramatic functional effects (2, 15). However, the effects of in-frame mutations involving the central domain could be more severe than expected from the Monaco rule (16, 17). Therefore, it is crucial to understand the molecular causes of the severity of certain in-frame mutations to anticipate future therapies. This could be achieved by structural and functional studies of the dystrophin central domain and of its protein products related to n-frame mutations.

X-ray crystallization of dystrophin repeats has been largely unsuccessful, likely due to the monomeric state of dystrophin. Repeats of two other family members — spectrin and α -actinin — have been crystallized in their biologically relevant dimer form and the only known crystal structure of a single R1 dystrophin repeat was obtained by chemically inducing dimerization (18), revealing a triple-helical coiled-coil structure typical of spectrin-like repeats. However, this structure does not allow for extrapolation of filament organization between successive repeats. Therefore, detailed structural data of larger domains are needed to acquire a precise understanding of dystrophin central domain organization and the effects of in-frame mutations on it. Due to its large size, dystrophin central domain is not amenable to current solution structural methods. Therefore, we report three-dimensional structural models of eight fragments covering the native dystrophin central domain and of the in-frame deletion of exons 45 to 47, the most frequent and severe BMD deletion, obtained by an integrative approach using small-angle X-ray scattering (SAXS) and molecular modeling. The central domain of dystrophin is far from a rod-like monotonous protein but presents numerous kinks that confer to dystrophin a tortuous and complex topology. This feature may explain how dystrophin interacts specifically with numerous partners to form a large dystrophin-associated protein complex. The BMD in-frame mutation we studied

profoundly modified dystrophin filamentous structure. This BMD-induced structural disorganization of the dystrophin involves nNOS binding domain disappearance and is confirmed by a total loss of nNOS labeling in muscle patient biopsies. These results show that the in-frame character of the deletion does not warrant a functional protein neither a stable protein structure and that our structural characterization of the dystrophin central domain should allow a better understanding of the dystrophin-associated molecular assembly and help for the design of future DMD gene therapies.

Results

Native dystrophin fragments display SAXS profiles compatible with monomers in solution. We dissected dystrophin in eight native purified fragments of the central domain covering 23 over the 24 repeats of the whole central domain (Figure 1A, Table S1). Proteins were obtained as pure (Figure 1B) and α -helix folded molecules as previously observed (19, 20). The Guinier approximation analysis of the SAXS curves indicated that the fragments were non-aggregated (Figure S1). However, due to the rod-shaped objects, the Guinier plots were obtained for narrow ranges of q values ($qR_g < 0.8-1.0$), especially for the longest dystrophin fragments such as R4-9, R11-15, R16-19 and R20-24 which cannot be considered globular, as previously shown (21). The radii of gyration R_g , obtained from the Guinier plots range from 22.0 to 78.6 Å (Table 1). These R_g values as well as Porod volumes, both correlate linearly with the expected molecular weights (MW) (Figure S1). Moreover, the MW obtained with the methods of Rambo and Tainer (22) and using Porod volumes are in good agreement with the MW of monomers (Table S2). These data are supported by SEC-MALS experiments performed for R1-3 and R11-15 fragments (Table S1). All these data confirm that the proteins are monomeric in solution.

The eight native fragments showed smooth SAXS scattering profiles with few structural features typical of elongated molecules (Figure 1C). The Kratky plots (Figure S2A) present a bi-modal shape with a well-defined maximum at q value of $\sim 0.1 \text{ \AA}^{-1}$ for all fragments, and a linear increase at $q > 0.3 \text{ \AA}^{-1}$. However, the Porod-Debye plots show a large plateau assessing the compactness of the protein fragments, to the relative exception of the R16-19 fragment that could be slightly more dynamic given the calculated Porod-Debye exponent (Table S2 and Figure S2B). These features are consistent with dystrophin fragments being folded proteins, and in agreement with circular dichroism observations (19). At the same time these results are compatible with the putative inter-repeat regions variability as previously described (23). The maximum particle size (D_{MAX}) values obtained from the radial distribution function $P(r)$ plots (Figure 1D, Table 1) increase with the molecular mass, confirming that the fragments are elongated in solution. All R_g values obtained from $P(r)$ functions are in line with first Guinier approximations (Table 1). Finally, we should notice that the $P(r)$ functions tail off smoothly, especially for the largest constructs. All $P(r)$ functions present a common peak at a short distance of $\sim 20 \text{ \AA}$, similar to the width of 21 \AA reported for the crystallized dystrophin single repeat R1 (18), likely

representing the width of the fragments. This feature is in agreement with the fact that all the fragments were in a monomeric state in solution. In all cases, except for R23, the $P(r)$ function plots presented additional peaks, notably one peak at around 40 - 50Å which represents the distance correlation between adjacent domains (i.e. repeat length). In summary the resulting data are characteristic of rather rigid but non-linear macromolecules. These features could be attributed to specific kinks located at linker regions, and delimiting the coiled-coil structured repeats, that would disrupt a purely rod-shaped filamentous molecule.

Three-dimensional analysis evidences a tortuous and complex structure of the dystrophin central domain. We used the SASFit program (24) to obtain values for radius, contour length and Kuhn length according to three different models: long cylinder model, worm-like chain model and Kholodenko worm model (Figure S3). This analysis suggests that the Kholodenko model is the most appropriate to describe the physical characteristics of the dystrophin fragments in solution. The radius of about 10.8 Å obtained for all fragments is in accordance with the R1 monomer radius (18). Contour length higher than D_{MAX} values calculated for the Kholodenko models indicate that the dystrophin fragments are shorter than a theoretical linear extended rod. This implies a dystrophin filament shape distinct from the rod-like structure previously assumed for the central domain of dystrophin(2, 15).

Twenty *ab initio* models, i.e. low-resolution molecular shapes, were simulated by the GASBOR method (25) for each protein fragment. All the models were superimposed using DAMSUP and analyzed by DAMAVER programs (ATSAS suite, 26). The molecular shapes converged remarkably for the R1-2, R1-3, R16-17 and R23 fragments, with normalized spatial discrepancy (NSD) values of 1.0 to 1.3 Å (Figure S4). For the two fragments R11-15 and R20-24, higher NSD were obtained. However, a look at the specific bulky volumes of the *ab initio* models indicates that DAMSUP placed some models head-to-tail regarding to the rest of the collection, resulting in a less efficient superimposition. Remarkably, the longest fragment R4- 9 showed a NSD of less than 2.0 Å, evidencing a regular molecular shape. Consistent with the SASFit analysis, the GASBOR models presented sharp kinks resulting in a highly tortuous topology.

Since most of the twenty calculated *ab initio* shapes converged to a globally homogeneous solution (Figure S4), we considered the best χ^2 *ab-initio* models – one for each fragment – as relevant guidelines to model dystrophin fragments at a higher resolution. These models were preferred to those generated by DAMAVER which do not fit the scattering curves. However, the presence of kinks precludes the simple superimposition of straight homology models obtained from spectrin templates (see Supporting Information) onto the kinked molecular shapes. Therefore, we applied the interactive flexible fitting procedure that we previously developed (27)(Supplemental Video 1) to explore the possible

deformations of the spectrin-based homology models. Structure quality check (Table S3) of the final structural models indicates that the initial biological structure composed of a coiled-coil filament is properly modulated to match the SAXS-derived molecular shape (Figure 2). In the final models, kinks placed at some inter-repeat linkers disrupt the straight rod-like structure of the dystrophin fragments. Finally, experimental SAXS scattering curves and the CRYSOLO theoretical curves produced from these structural models are in a range of less than 8% discrepancy for high q values that fall below 2% in low q values (Figure 2A). Consequently, these structural models suggest with confidence that the observed kinks are relevant features of the dystrophin central domain in solution (Figure 2B). All models have been successfully deposited in the SASBDB database, an international curated repository for small angle scattering data and models (28) (<http://www.sasbdb.org/>, see Supporting Information).

Similar to the crystal structures of spectrin and α -actinin, the B helices are generally bent in their middle (29, 30). However, the largest bends of α -helices are located at the inter-repeat linkers (Figure S5)(Supplemental Video 1). These kinks appear to be structured by several redundant features. Similar to successive spectrin repeats (29), the A/B loop of one repeat and the B'/C' loop of the following repeat interact strongly with each other and/or with the inter-repeat linker (Figure S6). In addition, the diversity in helix length in dystrophin compared to spectrin repeats (31) enables the modulation of kink amplitude and/or of the relative orientation of two successive repeats, mainly through the bending or partial unfolding of the inter-repeat linker (Figure S5). Among remarkable exceptions, we noticed the opposite behavior in the case of two of the largest observed kinks. First, the repeats R22 and R23 have respectively two particularly long A/B and B'/C' loops, which interact closely and induce a large kink at the linker (Figure S6B). The loops interaction results in a bulky extruded volume that can be clearly identified in the molecular shape (Figure 2D). Secondly, helix A of R14 and helix B' of R15 are the two shortest helices found in dystrophin repeats. *De facto*, in R14-R15, an A/B and B'/C' loop contact is not possible in a linear organization but with a large inter-repeat kink stabilized by a contact between helices B and B' (Figure S6C). Finally, kink angle values are modulated at the R1-2 and R16-17 inter-repeat linkers compared to the kinks observed in their longer overlapping fragments R1-3 and R16-19 (Table S4). This emphasizes potential dynamic behavior of the kink angles located at the inter-repeat linkers influenced by the succession of repeats.

The in-frame deletion of exons 45-47 profoundly disorganizes the structure of dystrophin at the new junction site. Building on these results, we next investigated the structural impact of the in-frame deletion of exons 45-47 in a purified mutant fragment R16-21 Δ 45-47 (Figure 3A and B). This mutation is the most frequently found in BMD and involves the loss of a part of the nNOS binding site (16). Guinier approximation gives a R_g value of 62.4 Å (Figure S7A). The bi-modal Kratky and Porod-Debye plots (Figure S7B and C) are consistent with an elongated and folded protein fragment, even if the

fragment seems less compact than the native dystrophin fragments (Table S2). $P(r)$ function from SAXS scattering curve of the mutant is leading to R_g and D_{MAX} values of 60.1 Å and 210 Å, respectively (Figure 3C, Figure S7D). Then, as previously done for the native fragments, the experimental SAXS data were used to constrain the molecular modeling calculations. Finally, even if the R16-21 Δ 45-47 protein fragment corresponds – with R16-19 fragment – to the sample presenting the lowest signal to noise ratio, we yet could confirm a reasonable rigidity and compactness through advanced analysis and we could conclude that *ab initio* models, and the derived atomistic models, are plausible structural representations of these protein fragments in solution. The final high-resolution model fitted into the best χ^2 *ab-initio* model showed a highly disordered topology by comparison to the filamentous structure of the corresponding native fragments (Figure 3D). A well maintained coiled-coil structure is observed for the four repeats R16, R19, R20 and R21 conserved from the native dystrophin form (Figure 3D). However, the R17//R18 non-native repeat shows a loss of coiled-coil organization that is replaced by loosely folded loops (Figure 3D inset). All this lead to a mutant model of less quality than those obtained for the native fragments (Table S3), probably due to the poorly structured regions, including the Hinge 3 (H3). This last H3 region is composed of 40 residues between the repeats R19 and R20 and could present a loosely tendency to fold into beta-hairpins (Figure S8). In our final mutant model, the A/B loop of R16 seems to lose its interaction with the B'/C' loop of R17 as it does in the R16-17 native fragment. This feature induces a disorganization of both the R16-R17 and the R18-19 inter-repeat linkers on each side of the deletion, which drastically alters the filament organization. Interestingly, this disorganization is more dramatic than previously inferred from modeling not using any experimental data (16).

Despite the preservation of a large part of the nNOS binding site in Δ 45-47 mutant, exon deletion profoundly impairs the dystrophin – nNOS interaction. Two approaches were undertaken to report for the nNOS binding in the dystrophin bearing the Δ 45-47 deletion. First, a rigid docking strategy similar to the one used in our previous work (32) showed that the contact frequencies of nNOS-PDZ onto the SAXS-derived Δ 45-47 model were significantly decreased compared to the wild type (Figure 4A). In particular, the two binding sites situated in the A/B helix of R16 and the linker R16-17 conserved in the Δ 45-47 mutant did not show any contacts with nNOS-PDZ. Low frequency contacts on the deleted dystrophin C-terminal domain are not sufficient for its interaction with nNOS-PDZ (Figure 4B). Secondly, immunostaining experiments of dystrophin and nNOS localization were carried out on muscle sections of five Δ 45-47 BMD patients and compared to normal muscle (Figure 4C). Dystrophin from normal muscle appears as an intense labeling surrounding the fibers. The nNOS μ positioning was validated by its sarcolemmal co-localization with dystrophin in normal muscle. In the muscles of the patients, dystrophin was detected at a level comparable to that of muscle control and was properly localized at the inner face of the membrane fibers. Despite the presence of dystrophin, in none of the patients labeling of nNOS could be detected (Figure S9). These results show that the nNOS binding is

not maintained by this in-frame deletion mutant, despite the preservation of two sequences of the wild type protein involved in the binding (32, 33). This observation should be mainly related to the disordered structure induced by the $\Delta 45-47$ deletion.

Discussion

The results presented here indicate that the classical concept of the central domain of dystrophin as a rod-shaped succession of 24 monotonous repeats (2, 15) should be revisited. Evidence that the structure of this domain is complex and tortuous was obtained using experimental SAXS methodology associated with molecular modeling. We suggest that the linker regions connecting rigid repeats confer kinked and non rod-shaped features to the central domain. Such large deviations from filament linearity have not yet been observed in crystal structures of the three-repeat spectrin fragments nor of the four-repeat α -actinin, but angle values in the range of 10 - 15° were reported for inter-repeat linkers in spectrin dimers by molecular simulation (34). The large kink angles observed here in dystrophin might be due to its monomeric nature, whereas spectrin and α -actinin filaments are tetramers or dimers. Notably, they could also be 'coded' by specific inter-region linker sequences. Indeed, the dimeric - tetrameric filaments of α -actinin and spectrin are structurally maintained by inter-repeat interactions enabled by similar lengths of all repeats, whereas, in the monomeric dystrophin filament, the repeats display highly heterogeneous lengths, thereby precluding dimerization (31). The presence of specific kinks within the dystrophin filament raises the question of their biological relevance and whether they represent hinge regions with adaptable angles. Indeed, the final structural models were obtained by interactively exploring the possible angles between successive repeats without unfolding of the repeats themselves, indicating that modifications of these kink angles could occur at low energy cost. It is interesting to note that the kink angle values between successive repeats are slightly modified when appearing in two different fragments such as the R1-2 kink angle in R1-2 and R1-3 and the R16-17 kink angle in R16-17 and R16-19. However, these modifications are restricted to specific spatial directions as imposed by the structural biology restraints established for coiled-coils. Incidentally, the looseness of the linkers could preclude the crystallization of the central domain of dystrophin.

The tortuous filamentous organization of the central dystrophin domain raises important questions about the biological construction of the entire dystrophin scaffold. Large inter-repeat kink angles break the spatial alignment of the central domain by changing the direction of neighboring repeats. This feature suggests that dystrophin should no longer be considered as a succession of independent building blocks (repeats) but rather as a succession of highly interdependent multi-repeat blocks constituting structural and/or interaction modules. This view is in line with the cooperative behavior of dystrophin repeats observed under unfolding conditions when stretched by optical tweezers (35). This compartmentalization may allow dystrophin to recruit protein partners simultaneously while bound to the plasma membrane

(36). In particular, the bulkiest molecules, intermediate filaments and F-actin, are recruited by the large R11-17 domain while microtubules are recruited by R20-23 (37) and due to steric hindrance, these interactions could not occur simultaneously with a straight central domain. Remarkably, these regions overlap with *DMD* gene mutational hotspots (exons 44 to 55) (6, 7). Other modules for binding smaller protein partners emerge from the kinked filament topology of dystrophin, including the PAR-1b by repeats 8 and 9 (38, 39) and nNOS by repeats 16 and 17 (32, 33).

The emergence of multi-repeat blocks as functional interaction modules is particularly evidenced here by the consequences of the BMD in-frame 45-47 deletion. Even though a large part of the dystrophin sequence to bind nNOS is present in the $\Delta 45-47$ mutant, the disorganization of the R16-17 module by the deletion explains why we observed (i) the strong decrease of nNOS protein expression in skeletal muscle localization in patients together with (ii) the impossibility to associate nNOS and the deleted dystrophin *in silico*. This observation could be related to the severity of this in-frame deletion (16) and could account at least partly for the heterogeneity of BMD phenotypes encountered with different deletions which may impair the nNOS binding to various degrees (40). Among these deletions, we are currently studying the deletion of exons 45 to 55 which could rescue 65% of DMD patients (13, 41).

Therefore, the maintenance of the best native-like dystrophin functional modules appears to be crucial in the design of therapeutic *micro-dystrophins* or exon-skipping/gene-editing products. Shortened *micro-dystrophins* have been designed based on BMD phenotypes by deleting some repeats that were assumed to be more dispensable than others (10, 12). Most of them were designed according to the less severe BMD deletion of exon 17 to 48 (8) and to the repeat phasing proposed by Harper (42). However, these *micro-dystrophins* were designed by considering repeats as elemental building blocks, without a true knowledge about the structural impact of disruption of the interdependent multi-repeat blocks and this remains to be investigated. *Exon-skipping* is a transcriptional therapeutic strategy expected to change DMD patients into BMD patients by subtracting additional exon(s) to restore the reading frame (9, 11). BMD deletions thus serve as patterns for DMD cure and until now they were all considered as equivalent based on the hypothesis that parts of the central domain could be subtracted without severely affecting dystrophin structure and function. Our results indicate clearly that this is not the case and that the longest in-frame transcript produced by exon-skipping is not necessarily optimal. Therefore, BMD deletions should be studied more in detail from a protein structure to function point of view, in order to anticipate the results of therapy of DMD patients before inducing their therapeutic production.

Materials and Methods

Cloning, protein expression and purification and biochemical characterization. The cloning, expression and purification procedures for five of the eight fragments (R1-2, R1-3, R11-15, R23 and

R20-24) have been described extensively in our previous papers (19) (details about sequences of fragments are shown in Table S1). R16-17 was obtained from Nick Menhart's team (20). The fragments R4-9 and R16-19 were newly overexpressed in *E. coli* and purified by similar procedures. The deletion mutant R16-21 Δ 45-47 was cloned, expressed and purified as previously described in detail (16). Proteins were characterized by circular dichroism (for details, see Supporting Information). The Hinge 3 region of human dystrophin was produced by Proteogenix (<http://www.proteogenix.fr/>) as a peptide of 47 residues with a molecular weight of 4.9 kDa and a purity of > 95%, analyzed by circular dichroism and nuclear magnetic resonance.

Small-Angle X-ray Scattering (SAXS) experiments. SAXS measurements were conducted either at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France) on the ID14-eh3 beamline (sample R11-15) or at the French synchrotron SOLEIL (St. Aubin, France) on the SWING beamline (all other samples). All experiments were performed at 15°C. For both set-ups, the scattering vector is defined as $q = 4\pi/\lambda \sin\theta$, where 2θ is the scattering angle. Data were collected in a q -range of 0.005–0.5 \AA^{-1} .

ID14-eh3 set-up. The data were collected on a 2D Pilatus 1M detector at a distance of 2.43 m ($\lambda = 0.933$ \AA). For R11-15 a series of 5 concentrations (1.1, 2.1, 4.6, 6.4 and 10.8 mg/ml) was prepared prior to injection into the SAXS capillary. Ten frames of 1.5 seconds each were collected with alternating TNE buffer (Tris 20 mM at pH 7.5, NaCl 150 mM and EDTA 0.1 mM) and R11-15 protein samples at increasing concentrations. All frames were then averaged for each data-set after visual inspection. SAXS data were directly evaluated using the Primus software, as implemented in the ATSAS 2.3 suite (26). The experimental SAXS data for all samples were linear in a Guinier plot of the low q region. These observations indicated that the sample did not aggregate. The radius of gyration R_g for R11-15 was derived from the Guinier approximation $I(q) = I(0) \exp(-q^2 R_g^2 / 3)$ for $qR_g < 0.8$. Data collected at high q using high protein concentrations and at low q using low protein concentrations were then merged, with the aim to minimize the particle interference occurring at low q and to maximize the signal/noise ratio at high q .

SWING set-up. All other samples data were recorded using an AVIEX170170 CCD detector at the distance of 1.807 to 1.845 m ($\lambda = 1.033$ \AA). For the constructs R1-2, R1-3, R4-9, R16-17, R16-19, R16-21 Δ 45-47, R23 and R20-24 a stock solution of each fragment was prepared at a final concentration between 8 and 15 mg/ml. A volume between 60 to 120 μl of protein samples was injected into a size exclusion column (Bio SEC-3 300 \AA , Agilent) and eluted directly into the SAXS flow-through capillary cell at a flow rate of 0.2 ml/min. The overall SEC-SAXS setup has already been described in previous work (43). The elution buffer consisted of TNE supplemented with 2% glycerol and 10 % acetonitrile for R16-19 and the BMD mutant. Two hundred fifty SAXS frames were collected continuously during the

elution at a frame duration of 1.5 s and a dead time between frames of 0.5 s. One hundred frames accounting for buffer scattering were collected before the void volume. The averaged buffer scattering was then subtracted from the protein signal. SAXS curves displaying a constant R_g in a R_g versus frame number plot were averaged (Figure S1A) and were used for further characterization. Data reduction to absolute units and frame averaging and subtraction were performed in FOXTROT (7).

SAXS data analysis. All subsequent data processing and analysis were conducted with the Scatter (<http://www.bioisis.net/>), SASFit (44) or PRIMUS software and other programs of the ATSAS suite. The SAXS data have been successfully deposited in the SASBDB database (28) and were validated following a expert quality control procedure (<http://www.sasbdb.org/>, see Supporting Information).

Guinier plots assess that all samples were not aggregated (Figure S1B and S7A). The distance-distribution function $P(r)$ and the maximum particle diameter (D_{MAX}) were calculated using the GNOM program (45). This approach offers an alternative calculation of R_g , which is based on the entire scattering spectrum (Table 1). Within a margin of error, these R_g values match those deduced from the first Guinier approximation. Scattering patterns $I(q)$ are also shown as Kratky plots ($q^2I(q)$ vs q , Figure S2A) indicating that *all proteins are properly folded in solution*. Typically, a globular, structured protein exhibits a pronounced maximum (bell-shaped curve), whereas a random chain (for example, an unfolded protein) will plateau (46-47). Then, Porod-Debye plots ($q^4I(q)$ vs. q^4) were generated and confirmed the compactness of all proteins (Figure S2B and Table S2).

Molecular weights (MW) are generally derived from the SAXS data using the I_0 or using a standard protein, generally BSA. Both methods need an accurate determination of the protein concentration. In the SEC-SAXS experiments, the UV detector saturated and the protein concentration cannot be accurately determined. Therefore, we relied on alternative methods to control the MWs of dystrophin fragments in solution: *i.e* size-exclusion chromatography multi-angle light scattering (SEC-MALS) for two of our constructs (R1-3 and R11-15), the Porod volume-based method and that proposed by Rambo and Tainer (21). SEC-MALS experiments were performed with an HPLC system (Agilent) equipped with an UV detector coupled with light scattering (miniDAWN Treos, Wyatt) and refractive index (Viscotek, Malvern) detectors. The refractive index increment value (dn/dc) of the proteins used to determine their molecular weight was 0.185 mL/g. Data were collected using a customized Bio SEC3 column (Agilent) equilibrated with TN buffer (Tris 20 mM pH 7.4, NaCl 150 mM) with a flow rate of 0.3 mL.min⁻¹. Data were processed with the ASTRA software v6.1. For the Porod volume-based method, we assume that the Porod volume in nm³ is about 1.6 times the MW in kDa (45). The method developed by Rambo and Tainer (21) was used to assess the monomeric state of all protein fragments employing the volume of correlation (V_c).

Structural models derived from the SAXS data. The overall *ab initio* models of the protein fragments were obtained from the SAXS experimental data using the GASBOR program (26). Following the standard procedure and using 50 harmonics, the scattering profiles were fitted to a $q_{max} = 0.45 \text{ \AA}^{-1}$ for all samples – except for R16-19 and R16-21 Δ 45-47, $q_{max} = 0.3 \text{ \AA}^{-1}$ (Figure S4A). Twenty independent GASBOR computations were performed for each scattering profile (each protein sample) and were superimposed using the SUPCOMB and DAMAVER programs (Figure S4B and S4C). This allowed to identify general structural features over the models of a given fragment, and thus, the result of the GASBOR computation with the smallest χ^2 was finally conserved as the unique *ab initio* model of each dystrophin fragment. This unique *ab initio* model was converted to a volume grid constraints (molecular shape) to guide the interactive flexible fitting simulations, as described in previous work (27). Dystrophin fragments homology models (with spectrin as structural pattern) were adjusted to the molecular shape by multiple interactive simulations exploring head-to-tail initial positions of the protein fragment (see Supplemental Movie and Supporting Information for details). All the final models were refined by a standard energy-minimization (27). Evaluation of the final structural models was performed using standard quality controls (Table S3, data provided by <http://services.mbi.ucla.edu/SAVES>). Alpha helices curvature in the structural models (Figure S5) was measured using the measure of kink amplitude between two consecutive dystrophin repeats by defining a main axis for each coiled-coil (Table S4). Validation of these models was done by calculating their theoretical SAXS curves with the CRY SOL program (26).

Analysis of dystrophin and nNOS interaction. First, a docking strategy already described (32) was used to search for contact frequencies between the SAXS-derived structural model of Δ 45-47 dystrophin mutant and the nNOS PDZ subdomain. Secondly, the nNOS immunolocalization was performed on muscle biopsies obtained from five BMD patients presenting the deletion of exons 45-47 from the French population (7). All details are described in the Supplementary experimental procedures.

Acknowledgements

This research was supported by research grants from the Association Française Contre les Myopathies, AFM-Téléthon, the Conseil Régional de Bretagne, RTR Biologie-Santé of the Université Européenne de Bretagne and the Grand Equipement National de Calcul Intensif - GENCI program (DYSIM project). AEM was recipient of a fellowship from AFM-Téléthon. AN was recipient from a Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) fellowship. We thank Dr Nick Menhart for providing purified R16-17 protein. We also thank the synchrotron facilities SOLEIL (St. Aubin) and ESRF (Grenoble) for allocating regular beam time and their dedicated staffs for technical help with the beamlines SWING and ID14-

EH3, respectively. We thank UMS BioSit for access to the spectroscopy facility. We warmly thank Jean-Claude Kaplan for skillful discussions and critical review of the manuscript. We gratefully thank Gabriel David and Blandine Pineau from synchrotron SOLEIL (St Aubin) for support in MALS experiments.

References

1. Hoffman, E. P., Brown, R. H., and Kunkel, L. M. (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919-928.
2. Koenig, M., Monaco, A. P., and Kunkel, L. M. (1988) The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53, 219-226.
3. Campbell, K. and Kahl, S. (1989) Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 338, 259-262.
4. Ervasti, J. and Campbell, K. (1991) Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 66, 1121-1131.
5. Monaco, A., *et al.* (1988) An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 2, 90-95.
6. Flanigan, K. M., *et al.* (2009) Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort. *Hum Mutat* 30, 1657-1666.
7. Tuffery-Giraud, S., *et al.* (2009) Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase. *Hum Mutat* 30, 934-945.
8. England, S., *et al.* (1990) Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of the dystrophin. *Nature* 343, 180-182.
9. Aartsma-Rus, A., *et al.* (2009) Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat* 30, 293-299.
10. Seto, J. T., Bengtsson, N. E., and Chamberlain, J. S. (2014) Therapy of Genetic Disorders-Novel Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy. *Curr Pediatr Rep* 2, 102-112.
11. Ricotti, V., Muntoni, F., and Voit, T. (2015) Challenges of clinical trial design for DMD. *Neuromuscul Disord* 25, 932-935.
12. Wilton, S. D., Veedu, R. N., and Fletcher, S. (2015) The emperor's new dystrophin: finding sense in the noise. *Trends Mol Med*.
13. Young, C. S., *et al.* (2016) A Single CRISPR-Cas9 Deletion Strategy that Targets the Majority of DMD Patients Restores Dystrophin Function in hiPSC-Derived Muscle cells. *Cell Stem Cell* 18, 1-8.
14. Wojtal, D., *et al.* (2016) Spell Checking Nature: Versatility of CRISPR/Cas9 for Developing Treatments for Inherited Disorders. *Am J Hum Genet* 98, 90-101.
15. Rahimov, F. and Kunkel, L. M. (2013) The cell biology of disease: cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy. *J Cell Biol* 201, 499-510.
16. Nicolas, A., *et al.* (2015) Becker muscular dystrophy severity is linked to the structure of dystrophin. *Hum Mol Genet* 24, 1267-1279.
17. Findlay, A. R., *et al.* (2015) Clinical phenotypes as predictors of the outcome of skipping around DMD exon 45. *Ann Neurol* 77, 668-674.

18. Muthu, M., Richardson, K. A., and Sutherland-Smith, A. J. (2012) The crystal structures of dystrophin and utrophin spectrin repeats: implications for domain boundaries. *PLoS One* 7, e40066.
19. Legardinier, S., *et al.* (2009) Mapping of the lipid-binding and stability properties of the central rod domain of human dystrophin. *J Mol Biol* 389, 546-558.
20. Mirza, A., Sagathevan, M., Sahni, N., Choi, L. and Menhart, N. (2010) A biophysical map of the dystrophin rod. *Biochim Biophys Acta* 1804, 1796-1809.
21. Putnam, C. D., Hammel, M., Hura, G. L., and Tainer, J. A. (2007) X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q Rev Biophys* 40, 191-285.
22. Rambo, R.P. and Tainer, J.A.(2013) Accurate assessment of mass, models and resolution by small-angle scattering. *Nature* 496 (7446), 477-481.
23. Bernado, P. (2010) Effect of interdomain dynamics on the structure determination of modular proteins by small-angle scattering. *Eur Biophys J* 39, 769-780.
24. Kohlbrecher, J. (2010), ed. Villigen, P. S. I.
25. Koch, M. H. J. and Svergun, D. I. (2003) Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. *Reports on Progress in Physics* 66, 1735-1782.
26. Petoukhov, M. V., *et al.* (2012) New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *J Appl Cryst* 45, 342-350.
27. Molza, A.-E., *et al.* (2014) Innovative interactive flexible docking method for multi-scale reconstruction elucidates dystrophin molecular assembly. *Faraday Discussions* 169, 45-62.
28. Valentini, E., *et al.* (2015) SASBDB, a repository for biological small-angle scattering data. *Nucleic Acids Res* 43, D357-363.
29. Grum, V. L., Li, D., MacDonald, R. I., and Mondragon, A. (1999) Structures of two repeats of spectrin suggest models of flexibility. *Cell* 98, 523-535.
30. Ribeiro Ede, A., Jr., *et al.* (2014) The structure and regulation of human muscle alpha-actinin. *Cell* 159, 1447-1460.
31. Winder, S. J., Gibson, T. J., and Kendrick-Jones, J. (1995) Dystrophin and utrophin: the missing links! *FEBS Letters* 369, 27-33.
32. Molza, A. E., *et al.* (2015) Structural Basis of Neuronal Nitric-Oxide Synthase Interaction with Dystrophin Repeats 16 and 17. *J Biol Chem* 290, 29531-29541.
33. Lai, Y., Zhao, J., Yue, Y., and Duan, D. (2013) alpha2 and alpha3 helices of dystrophin R16 and R17 frame a microdomain in the alpha1 helix of dystrophin R17 for neuronal NOS binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 525-530.
34. Mirijanian, D. T., Chu, J. W., Ayton, G. S., and Voth, G. A. (2007) Atomistic and coarse-grained analysis of double spectrin repeat units: the molecular origins of flexibility. *J Mol Biol* 365, 523-534.
35. Bhasin, N., *et al.* (2005) Molecular extensibility of mini-dystrophins and a dystrophin rod construct. *J Mol Biol* 352, 795-806.
36. Bajanca, F., *et al.* (2015) In vivo dynamics of skeletal muscle Dystrophin in zebrafish embryos revealed by improved FRAP analysis. *Elife* 4, 06541.
37. Belanto, J. J., *et al.* (2014) Microtubule binding distinguishes dystrophin from utrophin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 5723-5728.
38. Yamashita, K., *et al.* (2010) The 8th and 9th tandem spectrin-like repeats of utrophin cooperatively form a functional unit to interact with polarity-regulating kinase PAR-1b. *Biochem Biophys Res Commun* 391, 812-817.
39. Dumont, N. A., *et al.* (2015) Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. *Nat Med* 21, 1455-1463.
40. Gentil, C., *et al.* (2012) Variable phenotype of del45-55 Becker patients correlated with nNOSmu mislocalization and RYR1 hypernitrosylation. *Hum Mol Genet* 21, 3449-3460.
41. Beroud, C., *et al.* (2007) Multiexon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63% of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mutat* 28, 196-202.

42. Harper, S. Q., *et al.* (2002) Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nature Med* 8, 253-261.
43. Perez, J. and Nishino, Y. (2012) Advances in X-ray scattering: from solution SAXS to achievements with coherent beams. *Curr Opin Struct Biol* 22, 670-678.
44. Bressier, I. Kohlbrecher, J. and Thünemann, A.F. (2015) *J Appl Crystallogr* 20, 1587-1598.
45. Svergun, D. I., Petoukhov, M. V., and Koch, M. H. (2001) Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophys J* 80, 2946-2953.
46. Koch, M. H. J., Vachette, P., and Svergun, D. I. (2003) Small angle scattering: a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution. *Q. Rev. Biophys* 36, 147-227.
47. Skou, S., Gillilan, R. E., and Ando, N. (2014) Synchrotron-based small-angle X-ray scattering of proteins in solution. *Nat Protoc* 9, 1727-1739.

Figure Legends

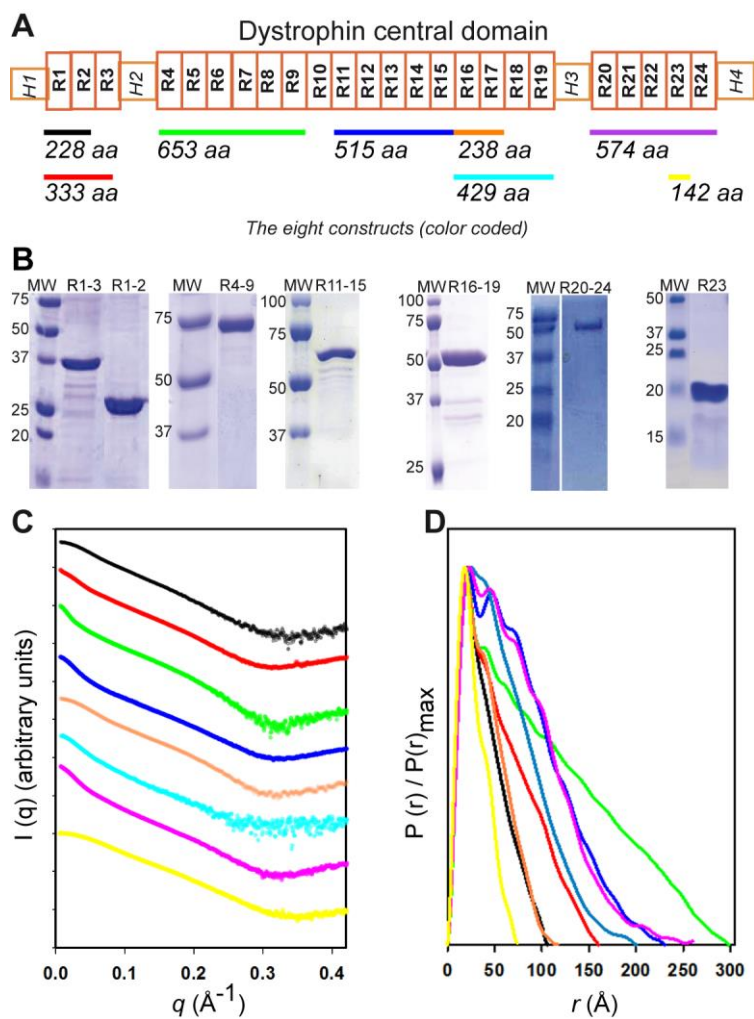


Figure 1. Experimental SAXS data obtained for the eight distinct native dystrophin fragments

(A) Schematic representation of the dystrophin central rod domain. It is comprised of 24 repeats (white boxes numbered R1 to R24) and four hinges (H1 to H4). The fragments studied here are highlighted by color-coded horizontal bars with indication of their length (number of amino acids). (B) SDS-PAGE of the fragments (R16-17 is not shown) indicates that they are reasonable pure and that they migrate at the expected molecular weight. (C) Experimental SAXS scattering profiles. The intensity values of each curve are shifted by applying a simple scale factor along the logarithmic axis to achieve clearer visualization. From top to bottom: curves R1-2, R1-3, R4-9, R11-15, R16-17, R16-19, R20-24 and R23 are displayed in the colors used in A. (D) The $P(r)$ distribution functions obtained by GNOM analysis are shown for the eight fragments (color-coded as in A); the maximum r value (D_{MAX}) of each fragment corresponds to its maximum dimension in abscissa.

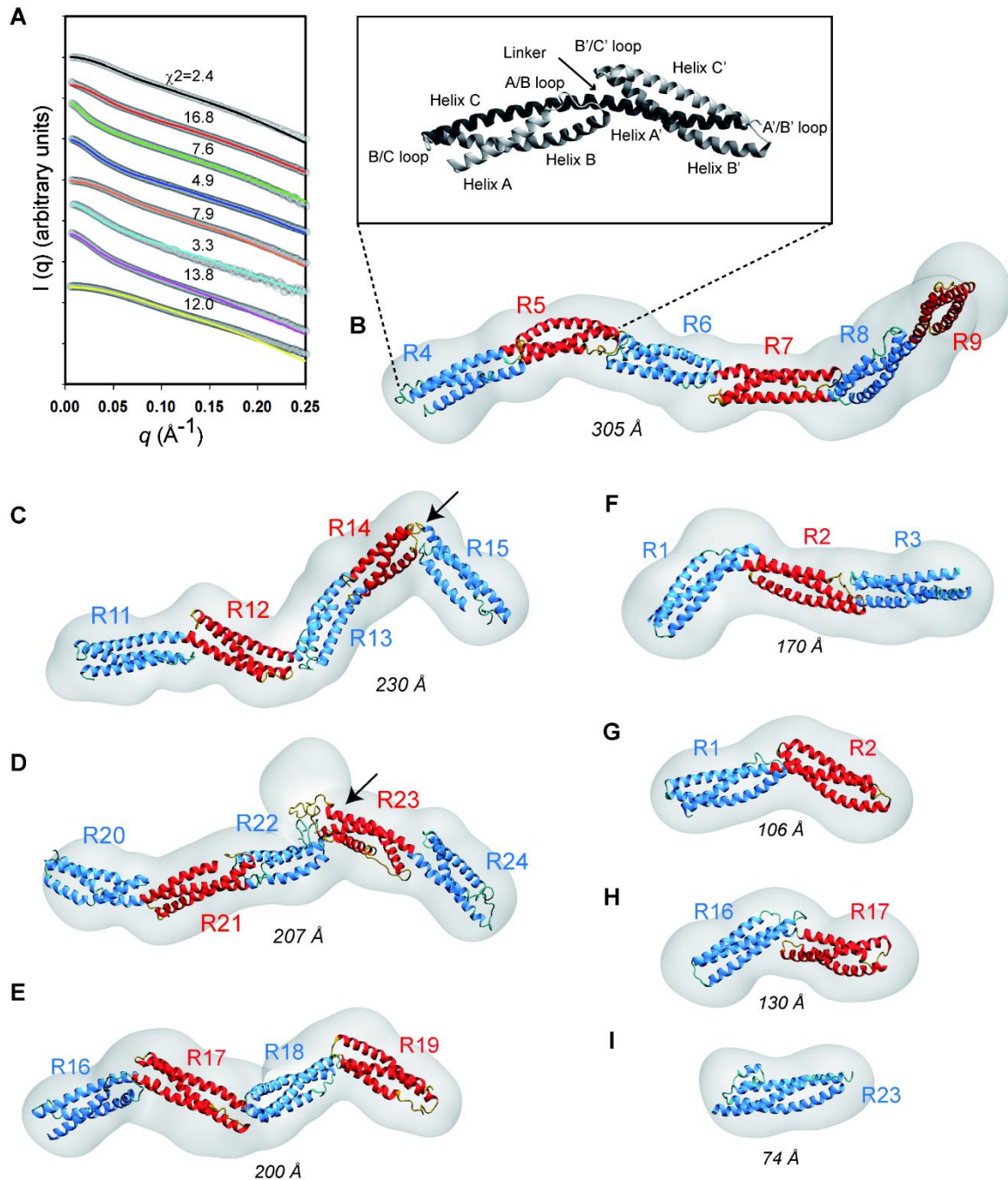


Figure 2. SAXS-derived three-dimensional structural models for the eight native dystrophin fragments

(A) Theoretical scattering curves obtained from the final structural models by a CRY SOL program calculation performed for each fragment. All theoretical curves are shown for $q < 0.25 \text{ \AA}^{-1}$ in a plain line superimposed onto its corresponding experimental grey-dotted line (color code as in Figure 1). Note that χ^2 values are quantitatively non-relevant due to the detectors providing low-error data. (B to I) The molecular shape obtained from GASBOR with the best χ^2 is shown for each fragment as a grey volume. The SAXS-derived structural models of each dystrophin fragment are overlaid onto its corresponding molecular shape in a cartoon representation. The α -helices of a coiled-coil repeat are colored in red or

blue for successive repeats. From the longest to the shortest fragment are shown (B) R4-9, (C) R11-15, (D) R20-24, (E) R16-19, (F) R1-3, (G) R1-2, (H) R16-17 and (I) R23. The D_{MAX} in Å is indicated for each fragment. Arrows indicate the two more pronounced kinks observed at the linker regions on the R11-15 and R20-24 fragments. The inset shows the structural organization of a two-repeat coiled coil with the three helices A, B and C of the first repeat and the helices A', B' and C' of the second repeat. The helices are connected by the A/B or A'/B' and B/C or B'/C' loops. The linker connecting the two repeats corresponds to a eight amino acids common helix bridging C and A'.

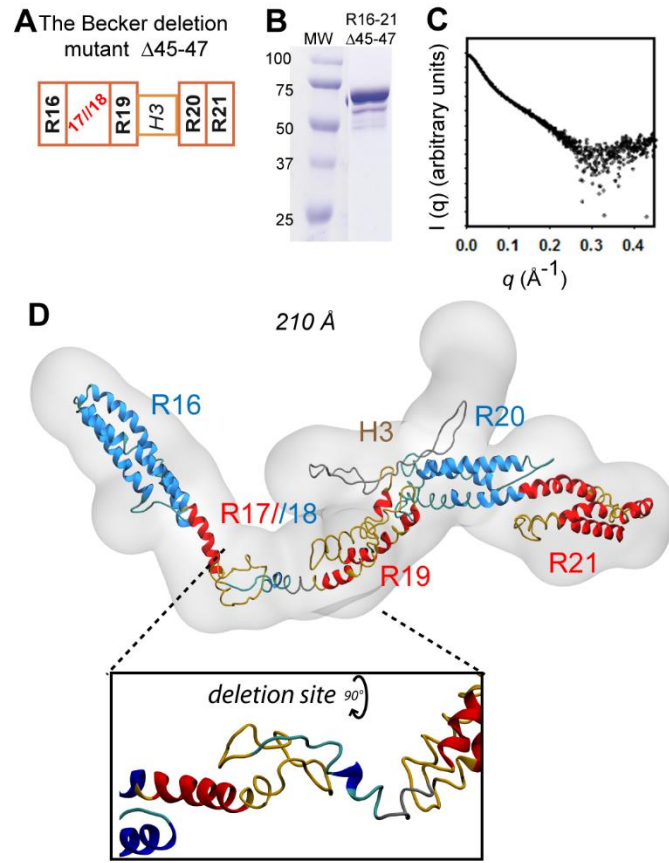


Figure 3. SAXS-based model of the R16-21 Δ 45-47 deletion mutant

(A) Schematic drawing of the Becker Δ 45-47 deletion in the R16-21 fragment of dystrophin. This mutation results in the deletion of the C-terminal part of R17 and the N-terminal part of R18, creating a non-native repeat termed R17//18. (B) SDS-PAGE of the fragment indicates that it is reasonable pure and migrates at the expected molecular weight. (C) The experimental SAXS scattering curve shows a lower signal-to-noise ratio for large q ($>0.2 \text{ \AA}^{-1}$) than in native fragments due to a lower sample concentration. (D) The structural model of the Becker Δ 45-47 deletion mutant is shown overlaid on the SAXS-derived molecular shape in grey volume. The *inset* highlights filament disorganization at the newly created junction site caused by the deletion as obtained through flexible fitting simulation.

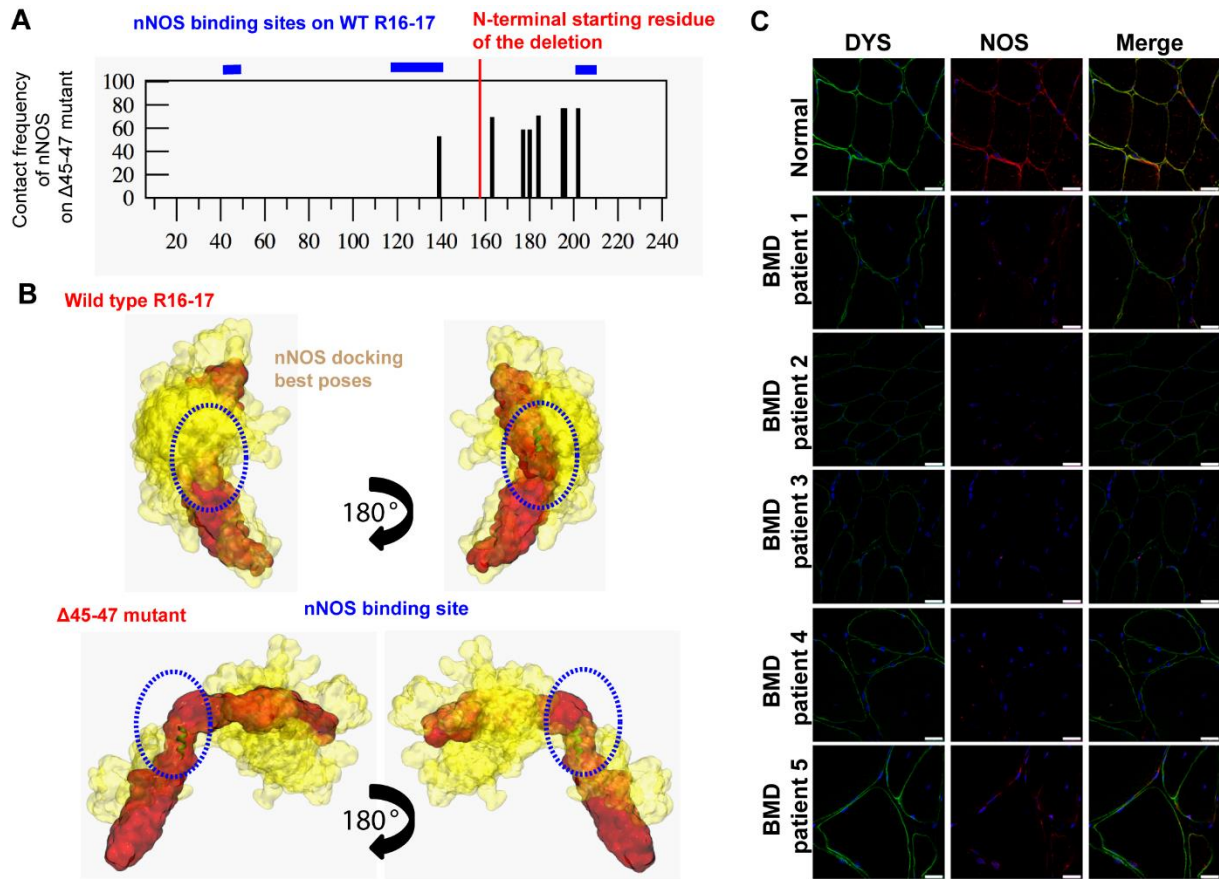


Figure 4: nNOS and dystrophin R16-17 binding in the BMD $\Delta 45-47$ deletion mutant.

(A) Contact frequency of nNOS on the deletion mutant $\Delta 45-47$ compared to the three binding sites of the wild type dystrophin repeats R16-17 (in blue lines above the graph). Abscissa represents the primary sequence of dystrophin fragment where the amino acids 1 to 158 are similar for the two proteins and the amino acids from 159 to 240 are specific for each of the proteins (the deletion starts at the residue 159). (B) Interaction sites with a high contact frequency ($>60\%$) projected onto dystrophin wild type R16-17 (top) and $\Delta 45-47$ mutant (bottom). The dystrophin proteins are shown in red and the ensemble of best nNOS poses are shown in yellow. (C) nNOS localization in Becker $\Delta 45-47$ muscles. Fixed frozen muscle sections ($8\ \mu\text{m}$) from normal control (Normal) and 5 Becker patients (BMD patient 1 to 5) were immune labelled with anti-C-terminal dystrophin (green) and anti-nNOS μ (red) antibodies, nuclei with DAPI (blue) and imaged by confocal microscopy. Scale bars are $25\ \mu\text{m}$.

Supporting information

(SI) Delalande et al.

SI Materials and methods

Cloning and protein purification. The plasmid pTG11025 harboring cDNA for the Dp427m muscle isoform of human dystrophin (P11532) (National Center for Biotechnology Information Nucleotide Data Base NM-004006, provided by S. Braun Transgene, France) was used as a template for the PCR amplification of eight wild type fragments and the Becker deletion mutant (Table S1).

The cloning, expression and purification procedures for five of the eight fragments (R1-2, R1-3, R11- 15, R23 and R20-24) have been described extensively in our previous papers (1, 2). Fragments were concentrated using centrifugal concentrators and the fragments were conditioned in Tris pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM buffer with 2% glycerol for radiation protection (TNEG buffer). R16-17 was obtained from Nick Menhart (3) and transferred to TNEG buffer. The fragments R4-9 and R16-19 were newly cloned, expressed, purified and concentrated by following similar procedures. Both GST- tagged fragments were purified by affinity chromatography. The R4-9 fragment required an additional ion exchange chromatography step, and the R16-19 fragment required isoelectric focusing for purification followed by size exclusion chromatography. The latter fragment was very difficult to obtain in the amount required for SAXS acquisition without aggregation. The addition of 10 % acetonitrile to the TNEG buffer prevented aggregation after the last purification step; thus, SAXS acquisitions were made in the presence of acetonitrile for the R16-19 fragment.

The deletion mutant R16-21 Δ 45-47 was cloned, expressed and purified as previously described in detail (4). Briefly, the protein was recovered in *E. coli* in the form of inclusion bodies, was solubilized with N-lauryl-sarcosine (0.1%), and was purified by affinity chromatography followed by hydrophobic chromatography. It was concentrated in TNE buffer (5% glycerol). Size exclusion chromatography was performed at the end of the purification process for each protein before concentration. Purity was confirmed by SDS-PAGE; all proteins appeared as unique bands at the expected molecular weights. Protein concentration was calculated using the absorbance at 280 nm and the theoretical molar extinction coefficient obtained from the ProtParam server (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Biochemical characterization

Circular dichroism was performed with a JASCO J-810 spectropolarimeter (Nantes, France) at a protein concentration of approximately 2.5 μM in TNE buffer. Spectra were acquired within the 200–250 nm range at 20°C with a path length of 0.2 cm. The percentage of α -helix was obtained using a 100% α -helix value of $-36000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ at 222 nm as previously described (2, 4). Thermal unfolding at 222 nm was followed by a temperature increase of 1 deg/min from 15 to 85°C. Because partial refolding after heating to 70°C was observed, indicating that denaturation was reversible, the CD signal was fitted to a two-state transition as previously described (2).

Acquisitions showed that all fragments were folded into alpha helices, as expected. The CD signal ratio observed at 208/222 nm was approximately 1, indicating that the R4-9 and R16-19 fragments were folded in coiled-coils, as previously shown for the fragments R1-2, R1-3, R11-15, R20-24, R23 and the deletion mutant R16-21 Δ 45-47 (2, 4).

Thermal unfolding of the R1-2, R1-3, R4-9, R11-15, R16-17, R23, R20-24 and deletion mutant R16-21 Δ 45-47 fragments was reported previously, and the melting temperatures ranged from 50 to 67°C (1, 2, 4). The R16-17 fragment was shown to have a melting temperature of 69.2°C (3). Melting temperatures for the two new fragments R4-9 and R16-19 were determined to be 61°C and 70°C, respectively. These values are comparable to those previously reported for R1-2, R1-3, R4-9, R11-15, R16-17, R23, R20-24 and the deletion mutant R16-21 Δ 45-47 fragments which range from 50°C to 69.2°C (1-4).

Small-Angle X-ray Scattering (SAXS) experiments.

SAXS measurements were conducted either at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France) on the ID14-eh3 beamline (sample R11-15) or at the French synchrotron SOLEIL (St. Aubin, France) on the SWING beamline (all other samples). All experiments were performed at 15°C. The purified protein solutions were centrifuged for ten minutes at 10,000 rpm prior to X-ray analysis to eliminate all aggregates, and their concentrations were then measured by UV absorption at $\lambda=280 \text{ nm}$ on a Thermo Scientific NanoDrop 1000 Spectrophotometer. For both set-ups, the scattering vector is defined as $q = 4 \pi/\lambda \sin\theta$, where 2θ is the scattering angle.

ID14-eh3 set-up. The data were collected on a 2D Pilatus 1M detector at a distance of 2.43 m ($\lambda= 0.933 \text{ \AA}$). For R11-15 a series of 5 concentrations (1.1, 2.1, 4.6, 6.4 and 10.8 mg/ml) was

prepared and stored at 4°C prior to injection into the SAXS capillary using an automatic liquid dispensing robot (sample changer). Ten frames of 1.5 seconds each were collected for alternating TNE buffer (Tris 20 mM at pH 7.5, NaCl 150 mM and EDTA 0.1 mM) and R11-15 protein samples at increasing concentrations, and were then averaged for each data-set after visual inspection. SAXS data were directly evaluated using the Primus software, as implemented in the ATSAS 2.3 suite (5). With the exception of a slight concentration dependence arising from particle interference in solution at low q values, the scattering profiles of all concentrations superimposed well at high q values. Also, the experimental SAXS data for all samples were linear in a Guinier plot of the low q region. These observations indicated that the sample did not aggregate. The radius of gyration R_g for R11-15 was derived from the Guinier approximation $I(q) = I(0) \exp(-q^2 R_g^2 / 3)$ for $qR_g < 0.8$. Data collected at high q using high protein concentrations and at low q using low protein concentrations were then merged, with the aim to minimize the particle interference occurring at low q and to maximize the signal/noise ratio at high q .

SWING set-up. All other samples data were recorded using an AVIEX170170 CCD detector at the energy of 12 keV. The detector was positioned at 1.807 to 1.845 m, and data were collected in a q - range of 0.005–0.5 Å⁻¹ ($\lambda = 1.033$ Å). For the constructs R1-2, R1-3, R4-9, R16-17, R16-19, R16-

21Δ45-47, R23 and R20-24 a24a stock solution of each fragment was prepared at a final concentration between 8 and 15 mg/ml. A volume between 60 to 120 μl of the protein samples were injected into a size exclusion column (Bio SEC-3 300 Å, Agilent) and eluted directly into the SAXS flow-through capillary cell at a flow rate of 0.2 ml/min. The overall SEC-SAXS setup is described elsewhere (6, 7). The elution buffer consisted of TNE supplemented with 2% glycerol and 10 % acetonitrile for R16-19 and the Becker deletion mutant. Two hundred fifty SAXS frames were collected continuously at a frame duration of 1.5 s and a dead time between frames of 0.5 s. Selected frames corresponding to the main elution peak were averaged using FOXTROT (7). One hundred frames accounting for buffer scattering were collected before the void volume. The averaged buffer scattering was then subtracted from the protein signal. SAXS curves displaying the same R_g in a R_g versus frames plot were averaged and used for further characterization (Figure S1). Data reduction to absolute units and frame averaging and subtraction were performed in FOXTROT.

SAXS data analysis

All subsequent data processing (Guinier approximation leading to R_g , D_{max} , Porod volumes and

Kratky plots) and analysis steps were conducted with the Scatter (<http://www.bioisis.net/>) or PRIMUS software and other programs of the ATSAS suite (5). The non-aggregated state of our fragments was also inferred by plotting the R_g value of an individual frame versus the frame number, following the chromatographic elution during data acquisition with SEC-SAXS that showed a constant R_g value throughout (Figure S1). Concerning the R11-15 fragment, SAXS was acquired using several concentrations of the sample. The final SAXS curve was obtained by merging the scattering signal for low and high values of q , since R11-15 showed a concentration dependent increase of the R_g value indicating intermolecular interactions; the ideal R_g value was thus calculated by extrapolation to zero concentration (Table S2). The distance distribution function $P(r)$ and the maximum particle diameter (D_{MAX}) were calculated by Fourier inversion of the scattering intensity $I(q)$. The GNOM program (8) was used to compute the distance-distribution function $P(r)$. This approach also features the maximum dimension of the macromolecule (D_{MAX}) and offers an alternative calculation of R_g , which is based on the entire scattering spectrum. Within a margin of error, these R_g values match those deduced from the Guinier approximation (Table S2). D_{MAX} was chosen carefully to minimize the differences between calculated R_g results and to maximize the “total estimate,” which indicates the agreement of the values of each criterion with their “ideal” values.

Scattering patterns, $I(q)$ are also shown as Kratky plots, generated by plotting $q^2I(q)$ vs. q , to assess whether directly report all proteins are properly folded in solution (Figure S2A). Typically, a globular, structured protein exhibits a pronounced maximum (bell-shaped curve), whereas a random chain (for example, an unfolded protein) will plateau (9-11). Then, Porod-Debye plots ($q^4I(q)$ vs. q^4) was generated and allowed the compactness of all proteins to be highlighted (Figure S2B). Additional EOM analysis fails to compute structural models in agreement with R_g and D_{MAX} (Figure S2C).

Determination of Construct Molecular Weights. Molecular weights (MW) are generally derived from the SAXS data using the $I(0)$ or using a protein of known concentration and MW, generally BSA. Both methods need an accurate determination of the protein concentration. In our SEC-SAXS experiments conditions, the UV detector saturated and the protein concentration cannot be accurately determined. Therefore, we relied on alternative methods to control the MWs of our constructs in solution: *i.e.* size-exclusion chromatography multi-angle light scattering (SEC-MALS) for two of our constructs (R1-3 and R11-15,) and the method developed by Rambo and Tainer (12) employing the volume of correlation (V_c) from the SAXS measurements for all fragments (Table S2). SEC-MALS experiments were performed with an HPLC

system (Agilent) equipped with an UV detector module, coupled with light scattering (mini-DAWN TreosminiDAWN Treos, Wyatt) and refractive index (Viscotek, Malvern) detectors. Refractive index increment value (dn/dc) of the proteins used to determine their molecular weight was 0.185 mL/g(ref). Data were collected using a customized Bio SEC3BioSEC3 column (Agilent) equilibrated with TN buffer (Tris 20 mM pH 7.4, NaCl 150 mM). The flow rate was 0.3 mL/min. Data were processed with the ASTRA software v6.1.4.25. The method developed by Rambo and Tainer (12) was used to assess the monomeric state of all proteins fragments.

Structural models derived from the SAXS data. Fitting procedures for form factor determination were done with the SASfit software (Figure S3) but to obtain more accurate models, we used the dummy residue modeling method implemented in GASBOR (13). This method builds *ab-initio* protein-like models (monte-carlo distribution of one particle per amino acid) with an average distance between dummy residues of 0.38 nm, corresponding to the mean value of the inter-residue distance in proteins. For comparison, the widely used DAMMIN approach computes models without *a priori* distance between the beads. Therefore, the GASBOR program improves the resolution and reliability of low-resolution protein models compared to DAMMIN. The scattering profiles were fitted to a $q_{max} = 0.45 \text{ \AA}^{-1}$ for all samples (except for R16-19 and R16-21 Δ 45-47, $q_{max} = 0.3 \text{ \AA}^{-1}$). Twenty independent GASBOR searches were calculated for each scattering profile (Figure S4). The residuals between GASBOR calculations and the initial scattering curves are plotted and represent less than 4% of the signal. This approach allowed general structural features of each reconstruction to be identified and is an assessment of the consistency of *ab initio* solutions by the normalized spatial discrepancy (NSD) (13, 14).

The model with the smallest χ^2 among the twenty independent runs by GASBOR calculations was taken for each dystrophin fragment and was converted to volume grid constraints for the interactive flexible fitting procedure, as described in previous work (15). In the aim to perform efficient interactive simulations, the straight homology models obtained previously and based on a spectrin- derived structural template (16) were converted into augmented Elastic Network Models at coarse- grain resolution. The filamentous coiled-coil structure was thus stabilized through a spring network presenting a lower density in the vicinity of inter-repeat junctions (i.e. linkers). Six independent interactive flexible fitting simulations were performed in both orientations of the N-terminal and C- terminal ends toward the extremities of the low-resolution molecular shape by following the BioSpring protocol developed previously (17). All-atom reconstructions were produced through a non- interactive BioSpring molecular dynamics simulation

of 20,000 steps. Finally, the twelve all-atom models obtained for each dystrophin fragment were optimized using a standard energy-minimization protocol (15). Evaluation of the atomic models was performed using the SAVES web server (<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES>). The best model for each dystrophin fragment was selected from the best quality scores provided by the ERRAT, Prove and ProCheck programs and according to the lowest residual signal between scattering curve and SAXS theoretical curve calculated with the CRY SOL program (ATSAS Suite, all default parameters, except the use of 50 harmonics). An ERRAT quality factor equal or higher than 95% was obtained for R1-2, R4-9, R11-15, R16-17 and R23, this value was about 90% for R1-3 and the two R16-19 and R20-24 have factors both at 84%. Ramachandran statistics with high percent of allowed and favored residues and low percent of outlier atoms were obtained (Table S3). The number of disallowed residues was high for several fragments but these residues are all located in loops, in correlation with the lower accuracy for positioning these highly flexible regions. The selected models were analyzed using the Bendix applet available for VMD. Alpha helix curvature in the final SAXS-derived all atom models was measured (18, Figure S5). Chimera software enabled the definition of the kink amplitude between two consecutive dystrophin repeats by defining a main axis for each coiled-coil and measuring the deviation angle between them (19, Table S4). All models have been successfully deposited in the SASBDB database, an international curated repository for small angle scattering data and models (20) (<http://www.sasbdb.org/>, see Supporting Information).

Analysis of Hinge 3 (H3) by circular dichroism and NMR. The Hinge 3 region of human dystrophin was produced by Proteogenix (<http://www.proteogenix.fr/>) as a peptide of 47 residues with a molecular weight of 4933.2 Da and a purity of >95%. The sequence, as follows, contains 6 PRO, 8 THR, 6 LEU and 5 VAL residues:

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>
QPD LAPGLTT IGASPTQTVT LVTQPVVTK E TAISKLEMP S L MLEV P			

Circular dichroism spectra at 20°C from 185 to 260 nm were obtained at a concentration of 0.1 mg/mL in water at varying values of pH, ranging from 4.8 to 10 adjusted using HCl or NaOH. All spectra showed a negative peak at 198–200 nm, which is characteristic of a predominantly disordered secondary structure (Figure S8A). However, analysis of the CD spectra on the Dichroweb website (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>) (21, 22) using the algorithm CDSSTR and the reference set3 indicates that 30% of β-strands are present, together with 45% of unordered regions and 25% of turns. The NMR spectra display amide proton resonance in a relatively narrow region centered at approximately 8.1 ppm, suggesting a random coil con-

formation for this peptide (Figure S8B). The weakness of the NOE connectivity (NOESY not shown) corroborates the absence of a well-defined structure for Hinge 3 in solution (Figure S8C).

Homology and *de novo* modelling of H3. Homology models used as starting structures for the interactive flexible fitting procedure were obtained as reported in our previous study on dystrophin fragments (16). Modelling of the H3 region was improved by following *de novo* structure prediction to avoid potential errors induced by poor sequence homology with putative patterns of the Protein Data Bank. The PEPfold program (<http://mobyli.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py?form=PEP-FOLD-forms:PEP-FOLD>), as well as I-TASSER and Robetta, predicted a beta sheet arrangement for a portion of the H3 peptide, in agreement with our analysis of the CD spectra. Based on the structure evaluation of the predicted hinge models, we selected a H3 fold for the R16-21Δ45-47 BMD fragment bearing beta-strands.

Immunostaining of Dystrophin and nNOS on Becker muscular dystrophy skeletal muscle.

Five BMD patients with the deletion of exons 45-47 and 1 patient as a control were studied for the immune-localization of dystrophin and nNOS μ . The five patients were followed in neuromuscular centers in France and they were symptomatic. The five patients were biopsied for diagnostic purposes after informed consent. The normal control muscle biopsy was obtained as surgical waste from orthopedic surgery of an individual without neuromuscular diseases. All biopsies were flash frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen. For immunostaining muscle analysis, sections of tissues were performed at 8 μ m on a cryostat (Leica CM3050S), fixed on glass slides.

Slides were rehydrated in phosphate-buffered saline (PBS), fixed with paraformaldehyde 4% for 10 min, permeabilized with 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) and blocked in PBS/4% bovine serum albumin/0.1% Triton X-100 for 1 h. Sections were incubated in PBS/2% BSA/0.1% Triton X-100 with the anti-nNOS (1:500), or with the anti-C-terminal dystrophin (1:500) overnight at room temperature, washed in PBS, incubated for 1 h with secondary antibodies, thoroughly washed in PBS, incubated with 4',6'-diamidino-2-phenylindole for nuclear staining for 5 min and mounted in Fluoromount (Southern Biotech). Images were acquired using $\times 40$ NA 1.4 objective lenses with Leica DM 2500 microscope the brightness/contrast was adjusted with Photoshop CS version 9.0.

SI figures and Tables

Table S1. The eight fragments of the dystrophin central rod domain and the Becker deletion mutant

Fragments (number of residues)	Starting of residue	Ending residue	N-terminus sequence		C-terminus sequence	
R1-2 (228)	338	563	GSEVNLD...		...QDILLKWQR	
R1-3 (333)	338	668	GSEVNLD...		...KSTAQISQA	
R4-9 (653)	718	1368	GSSEIRKRLD...		...LLEQS	
R11-15 (515)	1461	1973	GSFQKPAN...		...RLNFAQ	
R16-17 (238)*	1984	2216	GSVMTE DMPLEISYVPEEQKNILSEF QPV	
R16-19 (429)	1994	2420	GSSYVPS...		...LLQEL(RAKQPDL)**	
R23 (142)	2800	2939	GSLEASSDQW...		...IDETLERLQEL	
R20-24 (574)	2469	3040	GSVPALA...		...VRQLHE	

Becker deletion mutant (number of residues)	First residue N-terminus sequence	Last residue C-terminus sequence	Residue in terminal of deletion	Residue in C- terminal of the deletion	Sequence of the junction of the deletion	Molecular weight (kDa)
R16- 21Δ45- 47 (548)	1991 GSLEISYVPS...	2694 ...EETHRLLQQF	2146	2305	...WYLKVSRA...	63.9

Residues in **bold** indicate the start and end of the repeats according to the Winder alignment [36]. The GS in italics are residues added during cloning that remained after hydrolysis of the GST-tag by thrombin. *This construct was the kind gift of Nick Menhart [28]. **The sequence in parentheses was not cloned but is shown to indicate the end residue of the repeat R19.

Table S2: SAXS parameters for the eight native dystrophin fragments and the mutant

	R1-2	R1-3	R4-9	R11-15	R16-17	R16-19	R20-24	R23	R16-21 Δ 45-47
qR_g range (*)	0.21-0.80 (46)	0.78-0.99 (11)	0.54-0.98 (11)	0.38-0.95 (22)	0.32-0.79 (29)	0.78- 0.99 (11)	0.61-0.90 (11)	0.34-0.80 (43)	0.60 to 0.95 (11)
R_g (Å) from Guinier**	29.9 ± 0.1	43.2 ± 0.1	78.6 ± 0.3	59.4 ± 0.4	31.0 ± 0.1	46.9 ± 0.6	58.6 ± 0.2	22.0 ± 0.1	62.4 ± 0.8
R_g (Å) from $P(r)$ ***	31.2	45.8	85.4	60.9	32.0	49.9	60.9	22.0	60.1
Porod volume (nm ³)	42	68	123	87	47	70	107	20	184
MW_{expected} (kDa)	26.5	38.5	76.0	60.1	27.5	50.2	67.2	16.8	64.0
MW_{Porod}	26.3	42.5	76.9	54.4	29.4	43.8	66.9	12.5	115.0
MW_{V_c} (kDa)	21.1	29.1	49.1	46.6	22.8	42.4	53.9	12.7	89.1
$MW_{V_c \text{ real}}$ (kDa)	20.6	28.1	47.9	45.9	22.2	41.1	52.2	12.7	87.5
Porod-Debye Exponent	3.9	4.0	3.8	4.0	4.0	3.3	3.9	3.9	3.4

** Guinier approximation results in linear plots (FigureS1), allowing for the determination of R_g

*** Pair distribution function is shown in Figure 1D

Table S3: Quality controls of the molecular all-atom models under SAXS-derived volume constraints

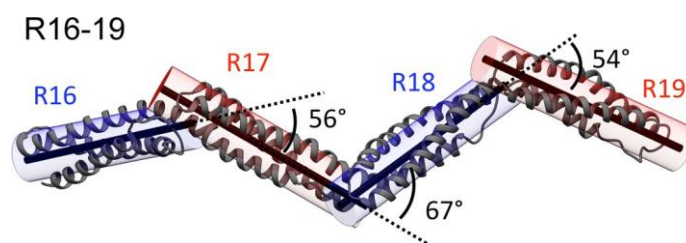
	ERRAT	PROVE	Ramachandran statistics by ProCheck			
	Quality factor	% outlier atoms	Favored	Additional allowed	Generously allowed	Disallowed
R1-2	94.8	3.9	90.8	4.9	1.9	2.4
R1-3	88.3	4.0	92.7	5.0	1.3	0.9
R4-9	96.7	3.0	87.3	8.3	1.6	2.8
R11-15	78.1	4.4	85.9	9.4	1.4	3.3
R16-17	96.5	7.4	84.2	7.7	5.0	3.2
R16-19	82.9	10.7	88.2	8.0	2.0	1.8
R20-24	84.4	7.7	74.2	14.0	6.1	5.7
R23	97.0	4.4	86.9	7.7	3.8	1.5
RΔ45-47	39.5	7.2	44.6	29.1	13.4	13.0

Table S4: Kink angles (in degree) measured between the main axes of two successive coiled-coil repeats, related to Figure 3 and 4

Fragments	R_n-R_{n+1} *	$R_{n+1}-R_{n+2}$	$R_{n+2}-R_{n+3}$	$R_{n+3}-R_{n+4}$	$R_{n+4}-R_{n+5}$
R1-2	40	-	-	-	-
R1-3	75	20	-	-	-
R4-9	40	20	35	55	20
R11-15	30	80	55	90	-
R16-17	45	-	-	-	-
R16-19	55	65	55	-	-
R20-24	40	45	65	55	-

*Coiled-coil repeat R_n is the first one of a given fragment and R_{n+1} is the following repeat.

**The angles are defined by Chimera (19). Main axis of a coiled coil is the axis of the encompassing cylinder for the three alpha-helices of a given repeat.



Inter-repeat kink angle measurements: the example of the R16-19 fragment model. Axis tool of the Chimera software allowed us to define a main axis for a set of atoms corresponding to dystrophin repeats in all the SAXS-derived models. Kink angles corresponding to the inter-repeat axis deviation were measured between the main axes of two consecutive repeats all along the filament.

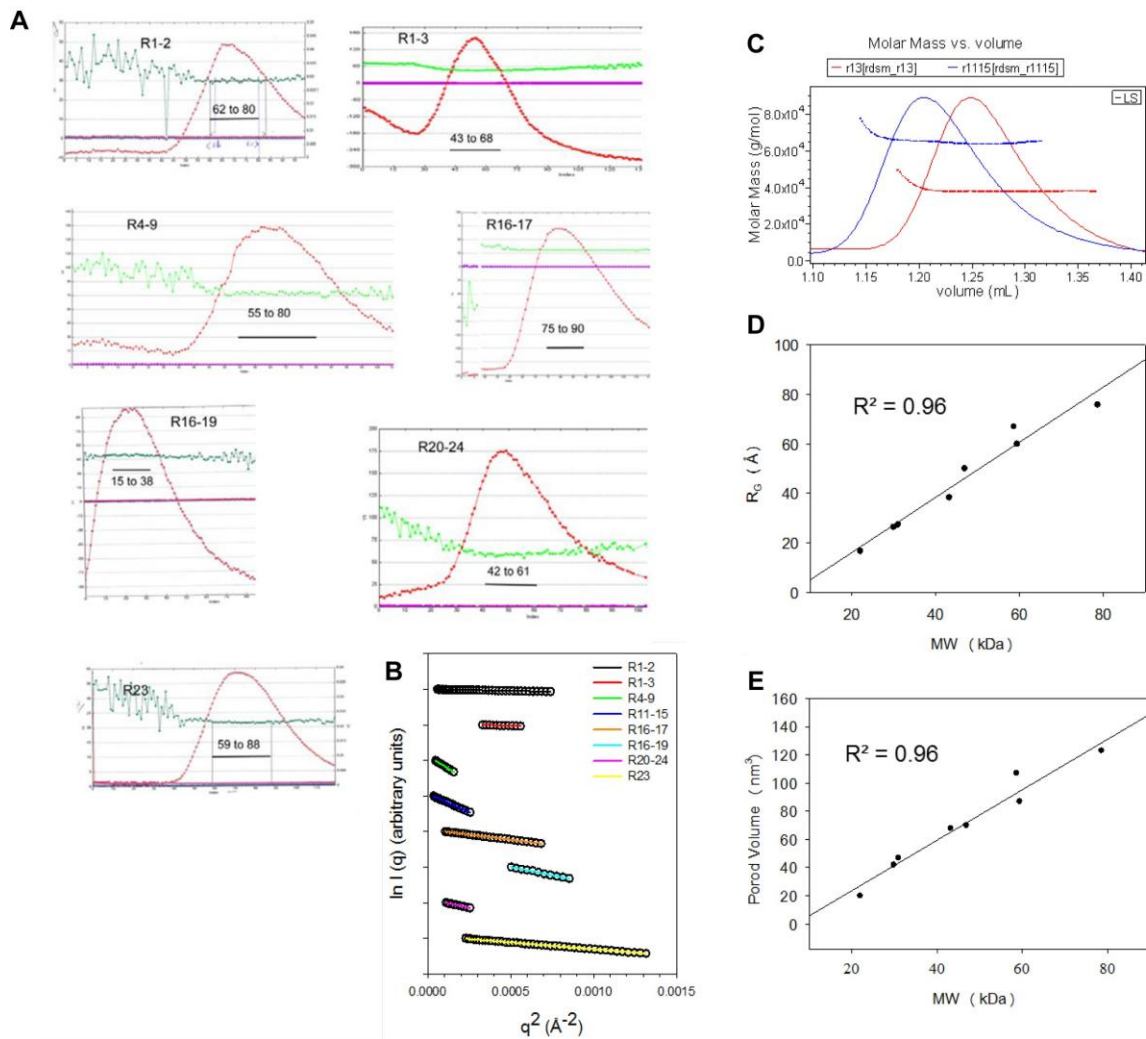
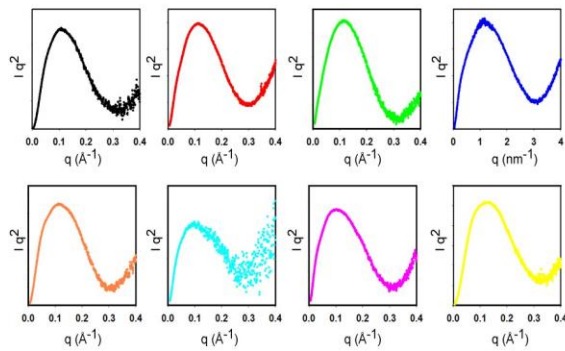


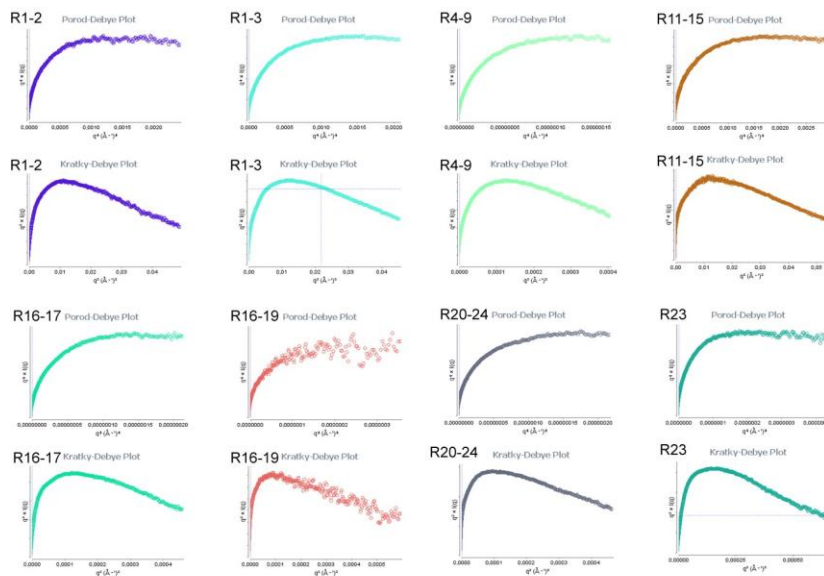
Fig. S1. Experimental SAXS data obtained for the eight distinct native dystrophin fragments.

(A) R_g versus the frame number plots of the SEC-SAXS data. The scattering curves presented in figure 1 were obtained by averaging the indicated frames, (B) Guinier plots in the lowest q region of the SAXS data (the limit is defined by $qR_g < 0.8-1.0$). The plots of the eight dystrophin native fragment scattering curves are color-coded as in diagram of Figure 1A (from top to bottom: R1-2, R1-3, R4-9, R11-15, R16-17, R16-19, R20-24, and R23). (C) SEC-MALS data of R1-3 and R11-15 assessing the monomeric state of the two proteins with experimental MWs of 38.2 ± 0.1 and 65.6 ± 0.4 kDa (top of the peak), respectively. R_g (D) and Porod volumes (E) versus the expected MW plots for the eight protein fragments.

A. Kratky Plots



B. Porod-Debye Plots



C. EOM analysis

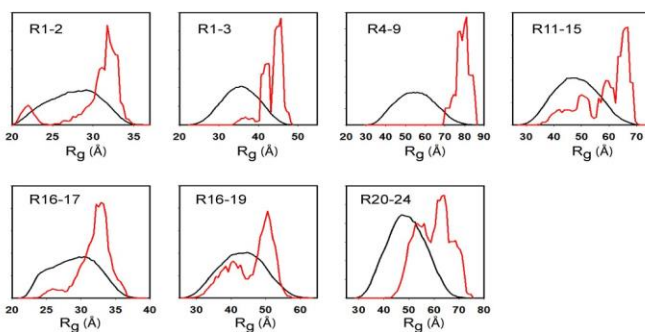


Fig. S2. (A) Kratky plots with the scattering vector S given in [\AA^{-1}] for all plots except for R11-15, for which it is in [nm^{-1}]. (B) Porod-Debye and Kratky-Debye plots were obtained from the on-line server BIoIIsis (<http://www.bioisis.net/welcome>). The plots for all fragments showed a plateau at the Porod-Debye and not at the Kratky-Debye, indicating that the fragments are more compact than flexible. (C) EOM analysis was performed through the server version of the program available online (<http://www.embl-hamburg.de/biosaxs/atsas-online/>). EOM is classically used to compute an ensemble of structural models in accordance to R_g and D_{MAX} obtained from analysis of SAXS data (see Table 1). This approach is particularly relevant in the case of independent subdomains separated from each other by poorly structured loop regions. In our study

of dystrophin fragments, we defined as inter-domains regions the four/eight last and four/eight first amino acids of two successive repeats. Ensembles of 10, 000 models were computed by EOM program to fit R_G and D_{MAX} parameters. Final results obtained for the seven different fragments bearing inter-repeat linkers (except the single repeat R23) were unable to propose model ensembles consistent with the SAXS-derived parameters (very low reliability chi-square values). Moreover, among the proposed models, most of them presented recurrent aberrant structural features as (i) dimeric association of two repeats and/or (ii) long range positioning of successive C-terminal amino acid of a given repeat towards the N-terminal amino acid of the following repeat. These results are in line with our proposition that repeats are modular subdomains separated by short linkers showing restricted flexibility.

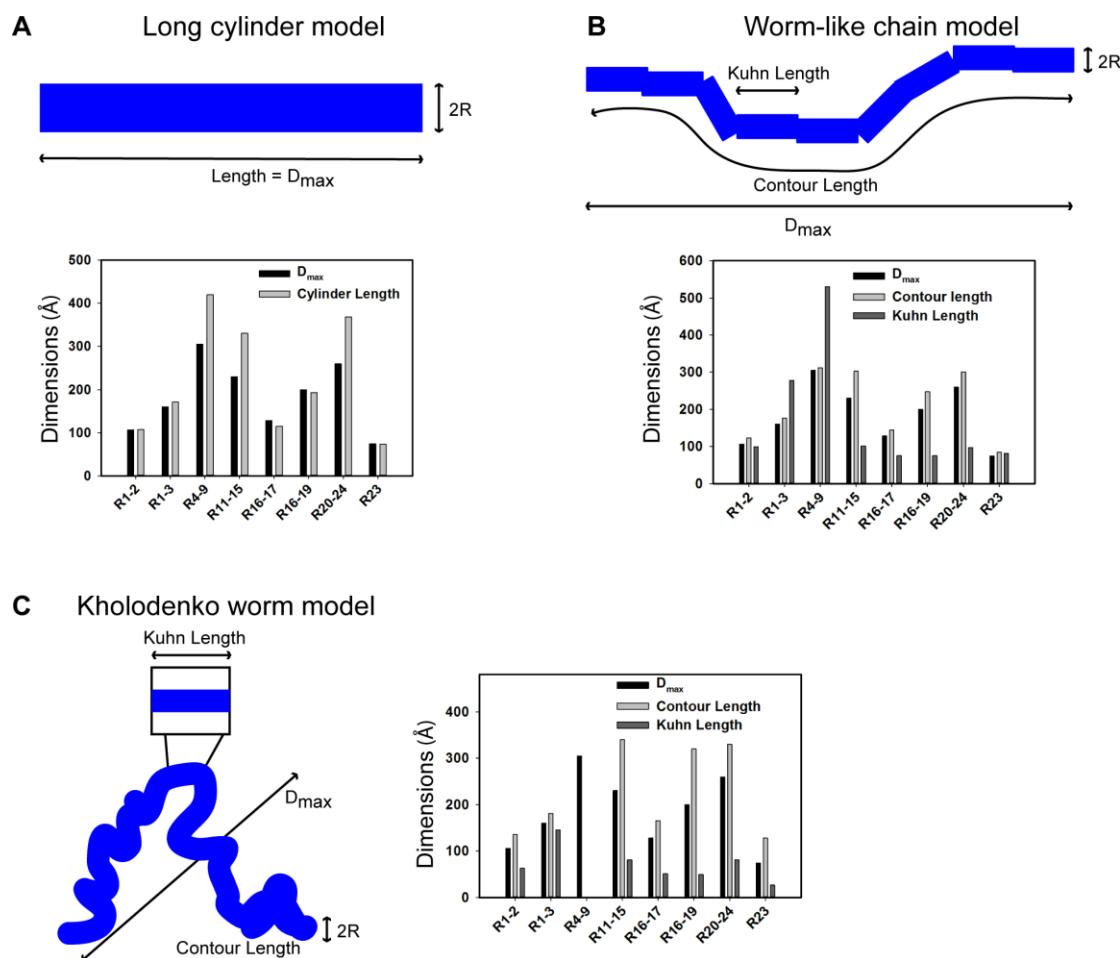


Fig. S3. SASfit analysis of the SAXS scattering curves for the eight dystrophin fragments.

The scattering curves were analyzed by SASFit with (A) a long cylinder model, (B) a worm-like chain model (WLCM) and (C) a Kholodenko worm model (23). The radii calculated are $12.6 \pm 1 \text{ \AA}$, $11.4 \pm 0.5 \text{ \AA}$ and $10.8 \pm 0.8 \text{ \AA}$ for the three models, respectively. They are all significantly different from each other ($p < 0.05$). Compared to the $\sim 10.5 \text{ \AA}$ value of the radius of the R1 crystal (24) and to the 20 \AA diameter value from the $P(r)$ distribution, the radius from the long cylinder model is $\sim 2 \text{ \AA}$ higher and the radius from the worm-like chain model is $\sim 1 \text{ \AA}$ higher (A and B). By contrast, the value from the Kholodenko worm model is similar to the radius of 10.5 \AA calculated from the crystal structure and to the 20 \AA diameter value from the $P(r)$ (C). This agreement suggests that the Kholodenko model is more appropriate to describe the physical characteristics of our dystrophin fragments in solution as derived from their SAXS curves. The cylindrical or contour length values computed by the SASFit program for each SAXS curve were compared to the D_{MAX} obtained from the $P(r)$ plot. The D_{MAX} value is actually the experimentally obtained maximum dimension of each fragment and if the fragments were pure elongated structures, there should be an adequacy between the D_{MAX} value and the cylindrical or contour lengths. The length of the long cylinder model fits with the D_{MAX} values for the shortest fragments R1-2, R1-3, R16-17, R16-19 and R23, whereas for the three other fragments, the length was longer than the D_{MAX} , showing an inadequacy of our fragments with a cylindrical model. This is confirmed by the data of the two other models, where the contour lengths are always longer than the D_{MAX} , to the exception of the computation for R4-9 fragment, which did not converge. The distortion from a cylindrical model and a contour length higher than D_{MAX} calculated by the two other models indicate that the dystrophin fragments are shorter than a theoretical linear extended rod and, consequently, should present kinks along their length. This analysis implies a molecular shape distinct from the rod-like structure previously assumed for the central domain of dystrophin (25, 26).

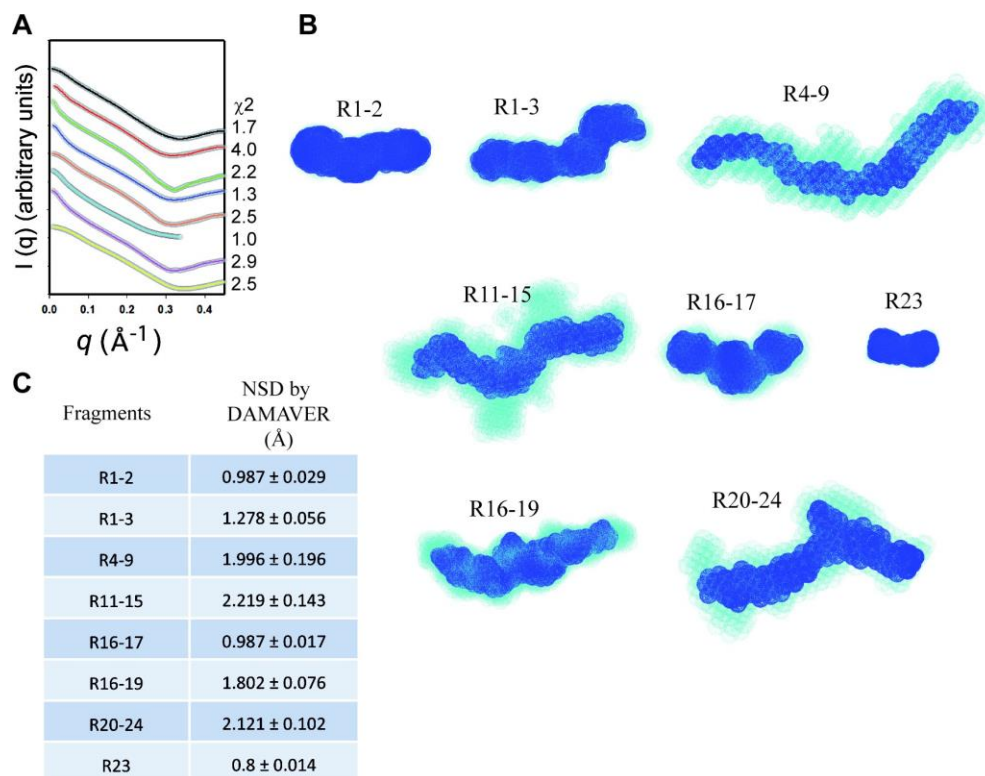


Fig. S4. Analysis of *ab initio* molecular shapes from GASBOR

(A) GASBOR fit for the *ab initio* models with the lowest χ^2 of each fragment (color-coded as in Figure 1A) (B) Twenty *ab initio* molecular shapes of the eight dystrophin fragments obtained by GASBOR program and analyzed using the ATSAS Suite (27). In light blue, the DAMSAVER results corresponding to the average molecular shape after superimposition fit obtained by DAMSAVER; in navy blue, the DAMFILT results allowing filtering of the averaged models. (C) Normalized spatial discrepancy (NSD) values for the 20 shapes are indicated.

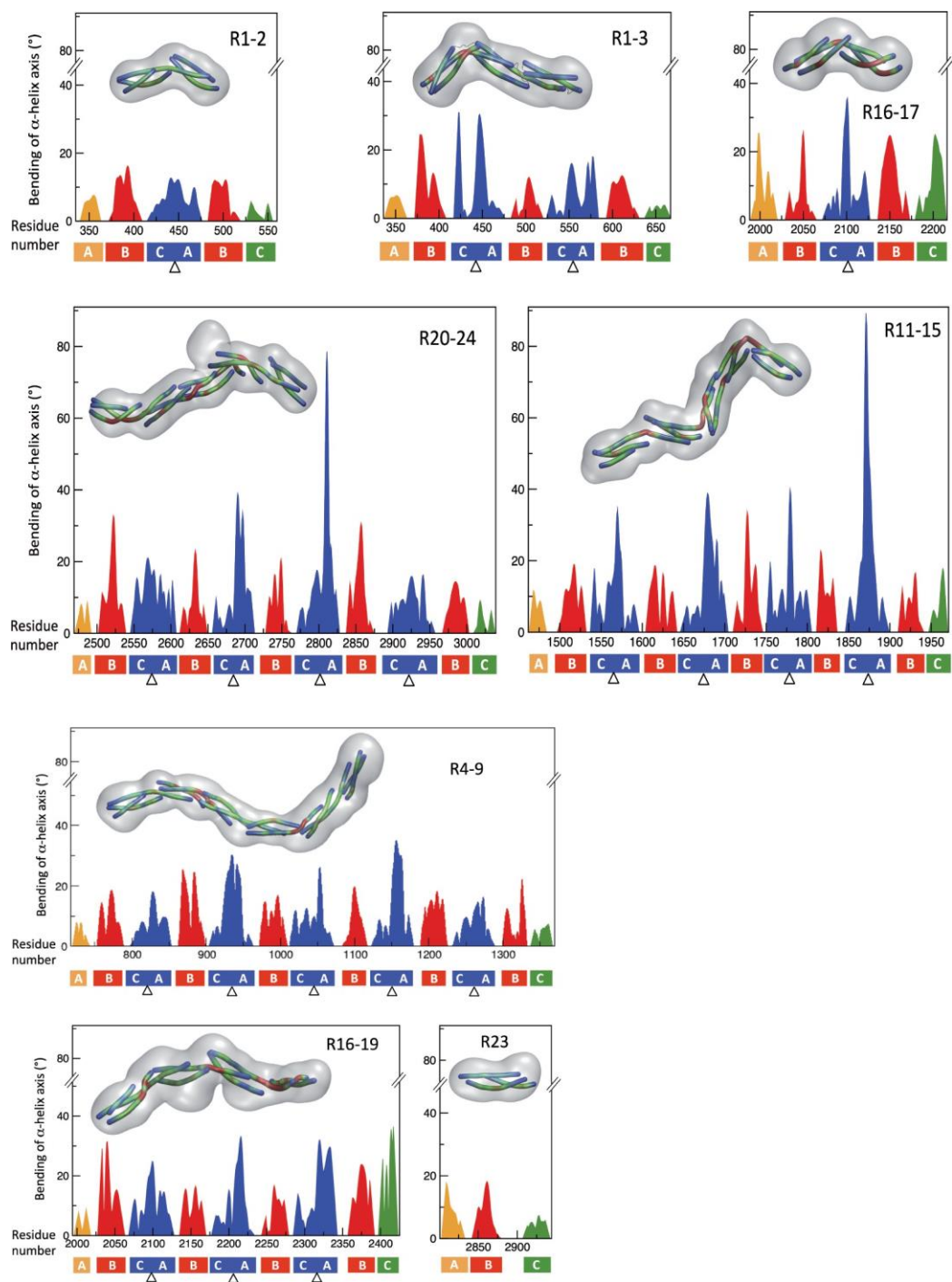


Fig. S5. Alpha helix bending analysis for all eight dystrophin fragment models

The best models obtained by SAXS-driven flexible fitting were analyzed using the Bendix (18) applet, available for VMD (28). The bending angle of alpha helices toward a straight theoretical axis was plotted (in $^{\circ}$) according to the primary sequence of each protein. Alpha helices are indicated under the primary sequence index, and inter-repeat linkers are represented by triangles. GASBOR shapes used for the flexible fitting of dystrophin models are drawn as translucent grey volumes. Model helices are drawn as colored cylinders following their bending intensity from light (blue) to moderate (green) to strong (red) intensities.

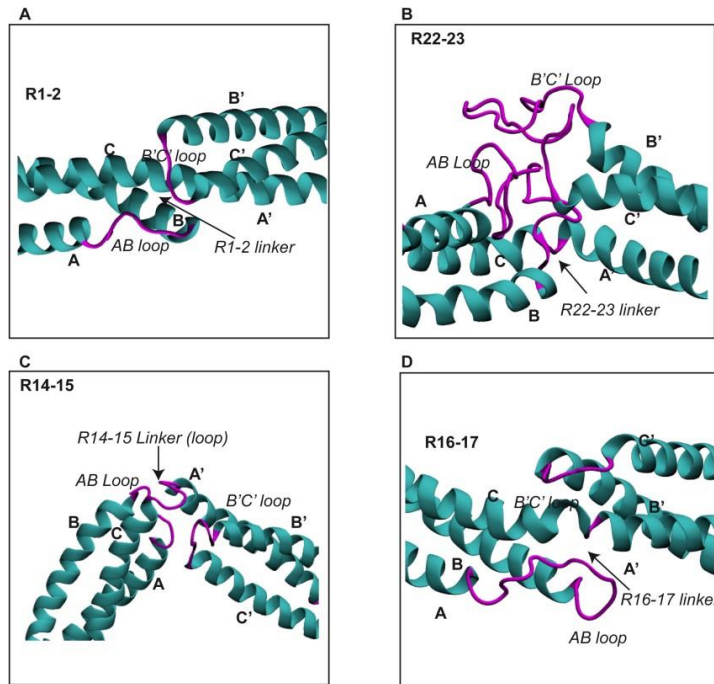


Fig. S6. Visualization of four inter-repeat linker topologies

(A) The interaction of the A/B loop of R1 with the B'/C' loop of R2 in the R1-2 model leads to a moderate kink (40°) in the linker. (B) Interaction of the long A/B and B'/C' loops of R22 and R23. (C) The linker between R14 and R15 is highly kinked and the A/B loop of R14 interacts strongly with the linker and with the B/C loop of R15 (D) A direct contact between helices B and B' is observed in the R16-17 structure that bears only a moderately kinked linker (45°), whereas no interaction between the R16 A/B loop and the R17 B'/C' loop occurs.

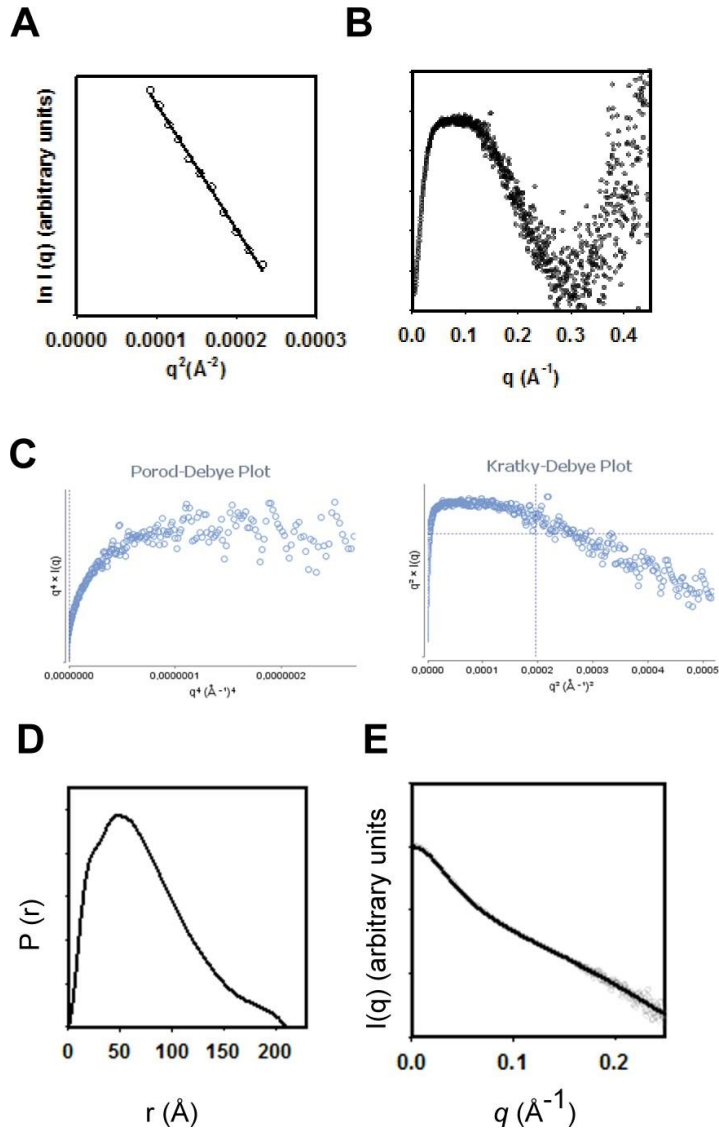


Fig. S7. SAXS-based model of the R16-21 Δ 45-47 deletion mutant

(A) Guinier plots in the lowest q region of the SAXS data (the limit is defined by $qR_g < 1.0$). (B) Kratky plots with the scattering vector S given in [\AA^{-1}]. (C) Porod-Debye plot as well as Kratky-Debye plot doesn't present a clear plateau could be related to a rather flexible protein fragment. (D) The $P(r)$ distribution indicates a shoulder at a distance of 20 \AA and a maximum at 48-50 \AA . (E) GASBOR fit for the shape with the lowest χ^2 .

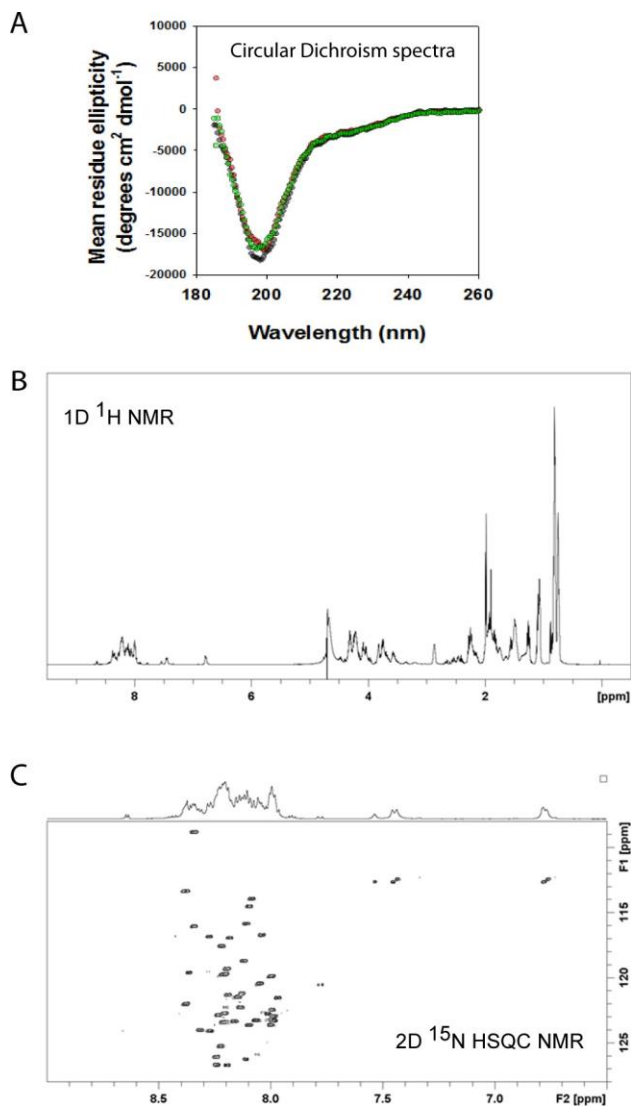


Fig. S8. Biochemical and biophysical analysis of the Hinge 3 peptide

(A) Circular Dichroism (CD) spectra of Hinge 3: the peptide concentration was 0.1 mg/mL in water and was examined at three different pH values: pH 5 (black), pH 7 (red) and pH 8.5 (green). Analysis of the spectra via the CDSSTR method using the Dichroweb server (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>)(21) showed that less than 10% of the peptide is composed of alpha helix, approximately 30% of beta-strand, 25% of turns and 35% of unordered secondary structure. (B) 1H–1D NMR acquisitions: NMR spectra were acquired on a Bruker Avance 500 spectrometer equipped with a 5-mm triple-resonance cryoprobe (^1H , ^{13}C , ^{15}N). The concentration of unlabeled protein was 15 mM at pH 4.5. (C) 2D ^{15}N -HSQC spectra were recorded at 298 K in phase-sensitive mode using the Echo anti-Echo method as matrices of 256 (t1) \times 4096 (t2) complex data points; 160 scans per t1 increment with a repetition time of 1.2 s and spectral widths of 12 and 40 ppm for ^1H and ^{15}N nuclei were used. Spectra were processed with Topspin (Bruker Biospin).

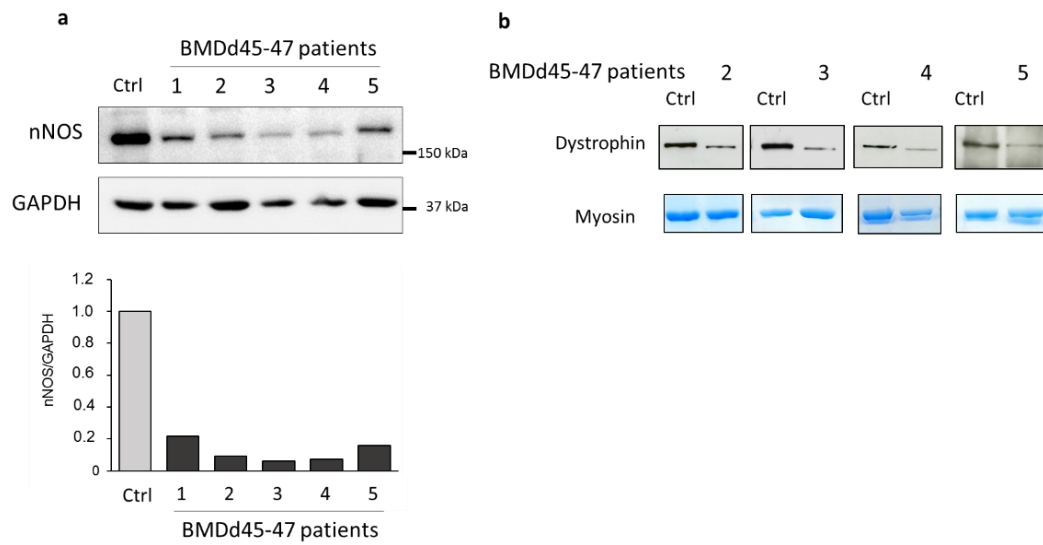
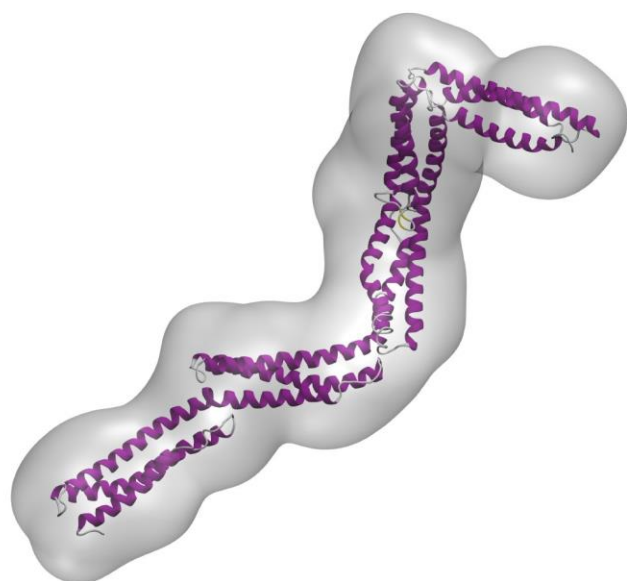


Fig. S9. nNOS and dystrophin R16-17 expression in the BMD Δ 45-47 deletion mutant

(a) nNOS protein expression in healthy (Ctrl) and Becker Δ 45-47 muscles, the graph represents the quantification of nNOS expression normalized to GAPDH signal by ImageJ. (b) dystrophin R16-17 expression in healthy (Ctrl) and the BMD Δ 45-47 muscles and myosin expression as the protein loading control.

Supplemental video S1



Supplemental video S1. Movie showing the reconstruction of structural models from SAXS data and molecular modelling and dynamic

References

1. Legardinier, S., *et al.* (2008) Sub-domains of the dystrophin rod domain display contrasting lipid-binding and stability properties. *Biochim Biophys Acta* 1784, 672-682.
2. Legardinier, S., *et al.* (2009) Mapping of the lipid-binding and stability properties of the central rod domain of human dystrophin. *J Mol Biol* 389, 546-558.
3. Mirza, A., *et al.* (2010) A biophysical map of the dystrophin rod. *Biochim Biophys Acta* 1804, 1796-1809.
4. Nicolas, A., *et al.* (2015) Becker muscular dystrophy severity is linked to the structure of dystrophin. *Hum Mol Genet* 24, 1267-1279.
5. Petoukhov, M. V., *et al.* (2012) New developments in the ATSAS program package for small- angle scattering data analysis. *J Appl Cryst* 45, 342-350.
6. Perez, J. & Nishino, Y. (2012) Advances in X-ray scattering: from solution SAXS to achievements with coherent beams. *Curr Opin Struct Biol* 22, 670-678.
7. David, G. & Perez, J. (2009) Combined sampler robot and high-performance liquid chromatography: a fully automated system for biological small angle X-ray scattering experiments at the synchrotron SOLEIL SWING beamline. *J Appl Cryst* 42, 892-900.
8. Svergun, D. I. (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J Appl Cryst* 25, 495-503.
9. Koch, M. H. J., Vachette, P., & Svergun, D. I. (2003) Small angle scattering: a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution. *Q Rev Biophys* 36 147-227.
10. Skou, S., Gillilan, R. E., & Ando, N. (2014) Synchrotron-based small-angle X-ray scattering of proteins in solution. *Nat Protoc* 9, 1727-1739.
11. Svergun, D. I., Petoukhov, M. V., & Koch, M. H. (2001) Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophys J* 80, 2946-2953.
12. Rambo, R. P. & Tainer, J. A. (2013) Accurate assessment of mass, models and resolution by small-angle scattering. *Nature* 496, 477-481.
13. Kozin, M. B. & Svergun, D. I. (2000) A software system for rigid-body modelling of solution scattering data. *J Appl Cryst* 33, 775-777.
14. Volkov, V. V. & Svergun, D. I. (2003) Uniqueness of ab initio shape determination in small- angle scattering. *J Appl Cryst* 36, 860-864.
15. Molza, A.-E., *et al.* (2014) Innovative interactive flexible docking method for multi-scale reconstruction elucidates dystrophin molecular assembly. *Faraday Discussions* 169, 45-62.
16. Legrand, B., *et al.* (2011) Computational Study of the Human Dystrophin Repeats: Interaction Properties and Molecular Dynamics. *Plos One* 6, e23819.
17. Tek, A., *et al.* eds. (2012) *Advances in Human-Protein Interaction - Interactive and Immersive Molecular Simulations* (InTech).
18. Dahl, A. C. E., Chavent, M., & Sansom, M. S. P. (2012) Bendix: intuitive helix geometry analysis and abstraction. *Bioinformatics* 28, 2193-2194.
19. Pettersen, E. F., *et al.* (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25, 1605-1612.
20. Valentini, E., *et al.* (2015) SASBDB, a repository for biological small-angle scattering data. *Nucleic Acids Res* 43, D357-363.
21. Whitmore, L. & Wallace, B. A. (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* 32, W668- 673.
22. Whitmore, L. & Wallace, B. A. (2008) Protein Secondary Structure Analyses from Circular Dichroism Spectroscopy: Methods and Reference Databases. *Biopolymers* 89, 392-400.
23. Kohlbrecher, J. (2010), ed. Villigen, P. S. I.
24. Muthu, M., Richardson, K. A., & Sutherland-Smith, A. J. (2012) The crystal structures of dystrophin and utrophin spectrin repeats: implications for domain boundaries. *PLoS One* 7, e40066.
25. Koenig, M., Monaco, A. P., & Kunkel, L. M. (1988) The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53, 219-226.
26. Rahimov, F. & Kunkel, L. M. (2013) The cell biology of disease: cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy. *J Cell Biol* 201, 499-510.
27. Petoukhov, M. V., *et al.* (2012) New developments in the ATSAS program package for small- angle scattering data analysis. *J Appl Cryst* 45, 342-350.
28. Humphrey, W *et al.* (1996) VMD - Visual Molecular Dynamics. *J Mol Graph* 14, 33-38.

III.4 Discussion

Il a été montré précédemment que la Dystrophine possédait un domaine de liaison à nNOS au niveau de ses répétitions de type-spectrine 16 et 17, dans des régions codées par les exons 42 à 46 (Molza *et al.* 2015). La délétion des exons 45 à 47 a donc un impact sur la liaison Dystrophine/nNOS.

L'étude présentée dans cette thèse, a pour objectif de mieux comprendre l'impact de la mutation del45-47 sur la structure de l'interaction Dystrophine/nNOS, mutation qui donne un phénotype BMD sévère. L'étude montre que le domaine central de la Dystrophine présente une structure filamenteuse tortueuse, complètement désorganisée lorsque les exons 45 à 47 du gène *DMD* sont délétés. Cette modification de structure entraîne une perte de l'interaction de la Dystrophine avec la nNOS bien que la majeure partie du site de liaison soit conservée. nNOS étant impliquée de façon importante dans la pathologie des dystrophinopathies (*cf.* Chapitre 1 Introduction II.4), notamment du fait de sa perte de localisation sarcolemmale, cette étude montre l'importance de la prise en compte de la structure de la Dystrophine lors de la mise au point de stratégies thérapeutiques telles que le saut d'exon thérapeutique, l'édition génétique ou la microdystrophine. Il apparaît en effet d'une importance majeure que la structure de la Dystrophine obtenue soit la plus proche possible de celle de la protéine native, afin de conserver ses propriétés, notamment la liaison avec ses protéines partenaires dont nNOS.

III.5 Contribution au projet

Dans ce projet, j'ai effectué les coupes des biopsies musculaires de patients et les immunomarquages Dystrophine/nNOS, ainsi que les Western-blots nNOS. Nous observons une perte de la localisation sarcolemmale de nNOS chez ces patients, accompagnée d'une nette diminution de l'expression, malgré la présence de Dystrophine. Ces résultats corroborent l'absence de contacts entre Dystrophine et nNOS observée par la modélisation de la structure.

Chapitre 3 :

Conclusions et perspectives

Le projet de cette thèse s'inscrit dans la nécessité de comprendre la différence phénotypique de patients BMD, à la fois pour optimiser des stratégies thérapeutiques ayant pour objectif d'amener les patients DMD à des transcrits respectant le cadre de lecture (saut d'exon thérapeutique, édition du génome), mais aussi pour permettre d'envisager des traitements thérapeutiques pour les patients BMD avec des phénotypes modérés à sévères.

Nos travaux ont été centrés sur l'implication d'ARN non-codants pouvant réguler des acteurs majeurs liés à la physiopathologie du muscle dystrophique. Dans ce cadre, nous avons identifié deux miARNs, le miR-708-5p et le miR-34c-5p comme ciblant la nNOS, une protéine impliquée dans de nombreux processus physiologiques du muscle squelettique et dans la physiopathologie des dystrophinopathies. Ce travail peut permettre d'expliquer une partie des processus pathologiques impliquant un déficit de nNOS (fatigabilité du muscle notamment, due à un déficit de la vasodilatation ou du métabolisme glycolytique) et éventuellement de les moduler en agissant sur l'expression des miARNs et donc de nNOS. La localisation sarcolemmale de nNOS étant un point majeur d'un fonctionnement correct de cette protéine dans le muscle, une modulation de l'expression de nNOS, associée à une thérapie permettant sa relocalisation (saut d'exon, édition génétique ou microdystrophine qui conserveraient le site de liaison à nNOS), participerait certainement à l'amélioration du phénotype chez les patients dystrophiques. En revanche, cette étude ne permet pas en l'état d'expliquer les différences de phénotypes observés dans la première cohorte de patients BMDdel45-55 (Gentil *et al.* 2012).

Nous avons également identifié des profils différents de lncARNs à partir d'ADN d'une deuxième cohorte de patients BMDdel45-55. Nous avons montré l'absence du lncINT55s et/ou du lncINT55as chez certains patients BMDdel45-55. Ces lncARNs se trouvent dans l'intron 55, qui borde la délétion des exons 45 à 55 décrite chez ces patients.

Ces travaux montrent l'importance de l'identification des points de cassure précis de la mutation, qui peuvent entraîner des modifications de profils des ARNs non-codants. Dans ce cadre, un projet de séquençage du génome entier est en cours afin de répondre à plusieurs questionnements :

Les points de cassures entraînent-ils la disparition ou l'apparition de lncARNs et/ou de cibles d'ARNs non-codants ?

Notre étude préliminaire nous a permis de mettre en évidence la disparition de lncARNs

décrits dans la littérature chez certains patients BMDdel45-55. Les introns 44 et 55 sont d'une taille particulièrement grande (près de 250 000 nucléotides pour l'intron 44 et plus de 120 000 nucléotides pour l'intron 55) laissant présager la séquence d'ARN non-codants non décrits ou encore la présence de cibles régulatrices qui pourraient être modulées différemment suivant les points de cassure. D'autre part, la délétion entraîne la formation d'un néo-intron, de séquence inconnue, composé des parties restantes de l'intron 44 et de l'intron 55. Il est possible que la mutation entraîne donc la formation d'une nouvelle séquence régulatrice et/ou d'une cible d'un ARN non-codant ou d'un gène modulateur.

Il est également à noter que les introns 44 et 55 comprennent chacun un promoteur d'une isoforme de la Dystrophine (Dp140 et Dp116 respectivement). En plus des séquences non-codantes il serait donc intéressant d'identifier comment la mutation impacte ces séquences promotrices et d'analyser les conséquences sur l'expression de la Dystrophine dans les tissus où ces isoformes s'expriment : le cerveau, la rétine et le rein pour la Dp140 et les cellules nerveuses périphériques pour la Dp116. La perte de l'isoforme Dp140 a été associée à une déficience cognitive, en particulier dans la DMD (Muntoni *et al.* 2003, Chamova *et al.* 2013). Les fonctions de la Dp116 sont peu étudiées dans les dystrophinopathies mais son expression dans le système nerveux périphérique pourrait être associée avec des complications telle que l'épilepsie que l'on retrouve dans une plus grande proportion chez les DMD que dans la population générale (Matsuo *et al.* 2017).

Une étude de l'impact des bornes de la délétion sur ces promoteurs et les conséquences sur l'expression des isoformes associées pourrait permettre de répondre, au moins en partie, à la différence de phénotypes observée chez ces patients BMDdel45-55.

Des variations nucléotidiques issues de polymorphisme (SNP pour *Single-Nucleotide Polymorphism*) existent-elles dans des gènes modulateurs ?

Plusieurs études montrent en effet, une implication de gènes modulateurs dans la DMD et la BMD. Ainsi, il a été montré que *SPPI*, le gène codant l'Ostéopontine, possédait des SNP qui pouvaient moduler le phénotype. Ainsi, un allèle G dans le SNP rs28357094 est corrélé à une perte plus précoce de la marche et à une diminution de la force (Pegoraro *et al.* 2011, Bello *et al.* 2015). De la même façon, le gène *LTBP4* possède 4 SNP qui forment des haplotypes différents qui vont coder les acides aminés VTTT ou IAAM. Ce dernier haplotype est décrit comme protecteur, avec une prolongation de la marche chez les patients possédant cet haplotype (Vo et McNally, 2015). Dans une autre étude des chiens GRMD, modèle canin de la DMD, ont un phénotype très modéré malgré l'absence de dystrophine (Vieira *et al.* 2015).

Les auteurs montrent que ces chiens ont en fait une variation génomique d'un nucléotide qui donne une séquence consensus pour la myogénine, un facteur de transcription musculaire qui va alors augmenter l'expression de Jagged1, une protéine qui intervient dans la voie Notch et qui va participer à la différenciation musculaire ainsi qu'à la régénération du muscle. Ces exemples illustrent l'intérêt d'une étude globale du génome chez les patients BMDdel45-55, chez lesquels on peut imaginer la présence de variations nucléotidiques ou de variations alléliques qui entraîneraient des améliorations ou des aggravations du phénotype.

Un polymorphisme nucléotidique dans le gène *DMD* ou dans le gène *NOS1* peut-il entraîner une augmentation ou une diminution de l'affinité de liaison de la Dystrophine et de nNOS ?

L'équipe de Le Rumeur a montré qu'une mutation dans les répétitions 16 et 17, sur lesquelles se fixe la nNOS, peut modifier l'affinité de l'interaction Dystrophine/nNOS (Molza *et al.* 2015). Il est de fait possible que des SNPs dans le gène *DMD* ou *NOS1*, puissent avoir un effet sur l'affinité nNOS/Dystrophine dans un contexte où une partie du site de liaison est déléetée. On peut ainsi imaginer que ces SNPs pourraient améliorer ou réduire l'affinité de liaison Dystrophine/nNOS et ainsi avoir un impact sur le phénotype dystrophique.

Le nombre croissant d'essais cliniques et l'intérêt de plus en plus important montré par la communauté scientifique et les industries pharmaceutiques aux dystrophinopathies laissent espérer l'apparition prochaine d'un traitement efficace pour ces maladies dévastatrices. Cependant, ce travail de thèse souligne la complexité des interactions croisées entre le gène muté, *DMD*, un de ses partenaires, la nNOS dont la transcription est une des plus complexes du génome et les ARNs non-codants, éléments récents de la régulation transcriptionnelle et traductionnelle, appuyant la nécessité d'une compréhension globale des mécanismes pathophysiologiques de ces maladies.

Bibliographie

Aartsma-Rus, A., Van Deutekom, J.C.T., Fokkema, I.F., Van Ommen, G.-J.B., and Den Dunnen, J.T. (2006). Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: An overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 34, 135–144.

Aartsma-Rus, A., Straub, V., Hemmings, R., Haas, M., Schlosser-Weber, G., Stoyanova-Beninska, V., Mercuri, E., Muntoni, F., Sepodes, B., Vroom, E., et al. (2017). Development of Exon Skipping Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy: A Critical Review and a Perspective on the Outstanding Issues. *Nucleic Acid Ther* 27, 251–259.

Alderton, J.M., and Steinhardt, R.A. (2000). Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *J. Biol. Chem.* 275, 9452–9460.

Allen, D.G., Whitehead, N.P., and Froehner, S.C. (2016). Absence of Dystrophin Disrupts Skeletal Muscle Signaling: Roles of Ca²⁺, Reactive Oxygen Species, and Nitric Oxide in the Development of Muscular Dystrophy. *Physiol Rev* 96, 253–305.

Amann, K.J., Renley, B.A., and Ervasti, J.M. (1998). A cluster of basic repeats in the dystrophin rod domain binds F-actin through an electrostatic interaction. *J. Biol. Chem.* 273, 28419–28423.

Aquilano, K., Baldelli, S., and Ciriolo, M.R. (2014). Nuclear Recruitment of Neuronal Nitric-oxide Synthase by α -Syntrophin Is Crucial for the Induction of Mitochondrial Biogenesis. *J Biol Chem* 289, 365–378.

Archer, J.D., Vargas, C.C., and Anderson, J.E. (2006). Persistent and improved functional gain in mdx dystrophic mice after treatment with L-arginine and deflazacort. *FASEB J.* 20, 738–740.

Asai, A., Sahani, N., Kaneki, M., Ouchi, Y., Martyn, J.A.J., and Yasuhara, S.E. (2007). Primary Role of Functional Ischemia, Quantitative Evidence for the Two-Hit Mechanism, and Phosphodiesterase-5 Inhibitor Therapy in Mouse Muscular Dystrophy. *PLoS ONE* 2.

Athanasopoulos, T., Graham, I.R., Foster, H., and Dickson, G. (2004). Recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors as therapeutic tools for Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Gene Ther* 11, S109–S121.

Baldelli, S., Barbato, D.L., Tatulli, G., Aquilano, K., and Ciriolo, M.R. (2014). The role of nNOS and PGC-1 α in skeletal muscle cells. *J Cell Sci* 127, 4813–4820.

Ballarino, M., Cazzella, V., D'Andrea, D., Grassi, L., Bisceglie, L., Cipriano, A., Santini, T., Pinnarò, C., Morlando, M., Tramontano, A., et al. (2015). Novel Long Noncoding RNAs (lncRNAs) in Myogenesis: a miR-31 Overlapping lncRNA Transcript Controls Myoblast Differentiation. *Mol Cell Biol* 35, 728–736.

Ballarino, M., Morlando, M., Fatica, A., and Bozzoni, I. (2016). Non-coding RNAs in muscle differentiation and musculoskeletal disease. *J. Clin. Invest.* 126, 2021–2030.

- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297.
- Barton, E.R., Morris, L., Kawana, M., Bish, L.T., and Torsell, T. (2005). Systemic administration of L-arginine benefits mdx skeletal muscle function. *Muscle Nerve* 32, 751–760.
- Baum, O., Schläppi, S., Huber-Abel, F.A., Weichert, A., Hoppeler, H., and Zakrzewicz, A. (2011). The beta-isoform of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) lacking the PDZ domain is localized at the sarcolemma. *FEBS Letters* 585, 3219–3223.
- Belanto, J.J., Mader, T.L., Eckhoff, M.D., Strandjord, D.M., Banks, G.B., Gardner, M.K., Lowe, D.A., and Ervasti, J.M. (2014). Microtubule binding distinguishes dystrophin from utrophin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 5723–5728.
- Bellinger, A.M., Reiken, S., Carlson, C., Mongillo, M., Liu, X., Rothman, L., Matecki, S., Lacampagne, A., and Marks, A.R. (2009). Hypernitrosylated ryanodine receptor/calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat Med* 15, 325–330.
- Bello, L., Kesari, A., Gordish-Dressman, H., Cnaan, A., Morgenroth, L.P., Punetha, J., Duong, T., Henricson, E.K., Pegoraro, E., McDonald, C.M., et al. (2015). Genetic modifiers of ambulation in the cooperative international Neuromuscular research group Duchenne natural history study. *Ann Neurol* 77, 684–696.
- Beltran, M., Puig, I., Peña, C., García, J.M., Álvarez, A.B., Peña, R., Bonilla, F., and de Herberos, A.G. (2008). A natural antisense transcript regulates *Zeb2/Sip1* gene expression during *Snail1*-induced epithelial–mesenchymal transition. *Genes Dev* 22, 756–769.
- Berger, J., and Currie, P.D. (2012). Zebrafish models flex their muscles to shed light on muscular dystrophies. *Dis Model Mech* 5, 726–732.
- Bérout, C., Tuffery-Giraud, S., Matsuo, M., Hamroun, D., Humbertclaude, V., Monnier, N., Moizard, M.-P., Voelckel, M.-A., Calemard, L.M., Boisseau, P., et al. (2007). Multiexon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63% of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mutat.* 28, 196–202.
- Bhosle, R.C., Michele, D.E., Campbell, K.P., Li, Z., and Robson, R.M. (2006). Interactions of intermediate filament protein synemin with dystrophin and utrophin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 768–777.
- Bodensteiner, J.B., and Engel, A.G. (1978). Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: a study of 567,000 muscle fibers in 114 biopsies. *Neurology* 28, 439–446.
- Bovolenta, M., Erriquez, D., Valli, E., Brioschi, S., Scotton, C., Neri, M., Falzarano, M.S., Gherardi, S., Fabris, M., Rimessi, P., et al. (2012). The DMD locus harbours multiple long non-coding RNAs which orchestrate and control transcription of muscle dystrophin mRNA isoforms. *PLoS ONE* 7, e45328.
- Braun, J.E., Huntzinger, E., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2011). GW182 Proteins Directly Recruit Cytoplasmic Deadenylation Complexes to miRNA Targets. *Molecular Cell* 44, 120–133.

- Brennan, J.E., Chao, D.S., Xia, H., Aldape, K., and Bredt, D.S. (1995). Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82, 743–752.
- Brennan, J.E., Xia, H., Chao, D.S., Black, S.M., and Bredt, D.S. (1997). Regulation of neuronal nitric oxide synthase through alternative transcripts. *Dev. Neurosci.* 19, 224–231.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2005). Principles of MicroRNA–Target Recognition. *PLoS Biol* 3.
- Broderick, J.A., and Zamore, P.D. (2011). MicroRNA therapeutics. *Gene Therapy* 18, 1104.
- Brodersen, P., and Voinnet, O. (2009). Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 141–148.
- Buono, R., Vantaggiato, C., Pisa, V., Azzoni, E., Bassi, M.T., Brunelli, S., Sciorati, C., and Clementi, E. (2012). Nitric oxide sustains long-term skeletal muscle regeneration by regulating fate of satellite cells via signaling pathways requiring Vangl2 and cyclic GMP. *Stem Cells* 30, 197–209.
- Bushby, K.M. (1999). Making sense of the limb-girdle muscular dystrophies. *Brain* 122 (Pt 8), 1403–1420.
- Bushby, K.M.D., and Gardner-Medwin, D. (1993). The clinical, genetic and dystrophin characteristics of Becker muscular dystrophy. *J Neurol* 240, 98–104.
- Bushby, K., Finkel, R., Birnkrant, D.J., Case, L.E., Clemens, P.R., Cripe, L., Kaul, A., Kinnett, K., McDonald, C., Pandya, S., et al. (2010). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *The Lancet Neurology* 9, 77–93.
- Cacchiarelli, D., Martone, J., Girardi, E., Cesana, M., Incitti, T., Morlando, M., Nicoletti, C., Santini, T., Sthandier, O., Barberi, L., et al. (2010). MicroRNAs Involved in Molecular Circuitries Relevant for the Duchenne Muscular Dystrophy Pathogenesis Are Controlled by the Dystrophin/nNOS Pathway. *Cell Metabolism* 12, 341–351.
- Cacchiarelli, D., Incitti, T., Martone, J., Cesana, M., Cazzella, V., Santini, T., Sthandier, O., and Bozzoni, I. (2011). miR-31 modulates dystrophin expression: new implications for Duchenne muscular dystrophy therapy. *EMBO Rep* 12, 136–141.
- Cesana, M., Cacchiarelli, D., Legnini, I., Santini, T., Sthandier, O., Chinappi, M., Tramontano, A., and Bozzoni, I. (2011). A Long Noncoding RNA Controls Muscle Differentiation by Functioning as a Competing Endogenous RNA. *Cell* 147, 358–369.
- Chamova, T., Guergueltcheva, V., Raycheva, M., Todorov, T., Genova, J., Bichev, S., Bojinova, V., Mitev, V., Tournev, I., and Todorova, A. (2013). Association Between Loss of Dp140 and Cognitive Impairment in Duchenne and Becker Dystrophies. *Balkan J Med Genet* 16, 21–30.
- Chang, W.J., Iannaccone, S.T., Lau, K.S., Masters, B.S., McCabe, T.J., McMillan, K., Padre, R.C., Spencer, M.J., Tidball, J.G., and Stull, J.T. (1996). Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9142–9147.

- Chao, D.S., Gorospe, J.R., Brenman, J.E., Rafael, J.A., Peters, M.F., Froehner, S.C., Hoffman, E.P., Chamberlain, J.S., and Bredt, D.S. (1996). Selective loss of sarcolemmal nitric oxide synthase in Becker muscular dystrophy. *J. Exp. Med.* *184*, 609–618.
- Chapat, C., Jafarnejad, S.M., Matta-Camacho, E., Hesketh, G.G., Gelbart, I.A., Attig, J., Gkogkas, C.G., Alain, T., Stern-Ginossar, N., Fabian, M.R., et al. (2017). Cap-binding protein 4EHP effects translation silencing by microRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *114*, 5425–5430.
- Chen, S., and Gao, G. (2017). MicroRNAs recruit eIF4E2 to repress translation of target mRNAs. *Protein Cell* *8*, 750–761.
- Chen, J.-F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., Conlon, F.L., and Wang, D.-Z. (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* *38*, 228–233.
- Chen, J.-F., Tao, Y., Li, J., Deng, Z., Yan, Z., Xiao, X., and Wang, D.-Z. (2010). microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J Cell Biol* *190*, 867–879.
- Chendrimada, T.P., Finn, K.J., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R.I., Liebhaber, S.A., Pasquinelli, A.E., and Shiekhattar, R. (2007). MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* *447*, 823–828.
- Clark, K.A., McElhinny, A.S., Beckerle, M.C., and Gregorio, C.C. (2002). Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *18*, 637–706.
- Coenen-Stass, A.M.L., Wood, M.J.A., and Roberts, T.C. (2017). Biomarker Potential of Extracellular miRNAs in Duchenne Muscular Dystrophy. *Trends in Molecular Medicine* *23*, 989–1001.
- Colussi, C., Mozzetta, C., Gurtner, A., Illi, B., Rosati, J., Straino, S., Ragone, G., Pescatori, M., Zaccagnini, G., Antonini, A., et al. (2008). HDAC2 blockade by nitric oxide and histone deacetylase inhibitors reveals a common target in Duchenne muscular dystrophy treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 19183–19187.
- Crawford, G.E., Faulkner, J.A., Crosbie, R.H., Campbell, K.P., Froehner, S.C., and Chamberlain, J.S. (2000). Assembly of the Dystrophin-Associated Protein Complex Does Not Require the Dystrophin CooH-Terminal Domain. *The Journal of Cell Biology* *150*, 1399–1410.
- De Arcangelis, V., Strimpakos, G., Gabanella, F., Corbi, N., Luvisetto, S., Magrelli, A., Onori, A., Passananti, C., Pisani, C., Rome, S., et al. (2016). Pathways Implicated in Tadalafil Amelioration of Duchenne Muscular Dystrophy. *J. Cell. Physiol.* *231*, 224–232.
- Deng, S., Zhao, Q., Zhou, X., Zhang, L., Bao, L., Zhen, L., Zhang, Y., Fan, H., Liu, Z., and Yu, Z. (2016). Neonatal Heart-Enriched miR-708 Promotes Differentiation of Cardiac Progenitor Cells in Rats. *Int J Mol Sci* *17*.
- Denninger, J.W., and Marletta, M.A. (1999). Guanylate cyclase and the ·NO/cGMP signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* *1411*, 334–350.

- Derry, M.C., Yanagiya, A., Martineau, Y., and Sonenberg, N. (2006). Regulation of Poly(A)-binding Protein through PABP-interacting Proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71, 537–543.
- Doench, J.G., and Sharp, P.A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 18, 504–511.
- Ehmsen, J., Poon, E., and Davies, K. (2002). The dystrophin-associated protein complex. *Journal of Cell Science* 115, 2801–2803.
- 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. (2007). Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17016–17021.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188–200.
- Elfering, S.L., Sarkela, T.M., and Giulivi, C. (2002). Biochemistry of Mitochondrial Nitric-oxide Synthase. *J. Biol. Chem.* 277, 38079–38086.
- Emery, A.E. (1991). Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul. Disord.* 1, 19–29.
- Ervasti, J.M., and Campbell, K.P. (1993). A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J. Cell Biol.* 122, 809–823.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2009). Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* 15, 21–32.
- Fabb, S.A., Wells, D.J., Serpente, P., and Dickson, G. (2002). Adeno-associated virus vector gene transfer and sarcolemmal expression of a 144 kDa micro-dystrophin effectively restores the dystrophin-associated protein complex and inhibits myofibre degeneration in nude/mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* 11, 733–741.
- Feener, C.A., Koenig, M., and Kunkel, L.M. (1989). Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature* 338, 509–511.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9, 102–114.
- Fiorillo, A.A., Heier, C.R., Novak, J.S., Tully, C.B., Brown, K.J., Uaesoontrachoon, K., Vila, M.C., Ngheim, P.P., Bello, L., Kornegay, J.N., et al. (2015). TNF- α -Induced microRNAs Control Dystrophin Expression in Becker Muscular Dystrophy. *Cell Rep* 12, 1678–1690.
- Förstermann, U., and Sessa, W.C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33, 829–837.
- Foster, H., Sharp, P.S., Athanasopoulos, T., Trollet, C., Graham, I.R., Foster, K., Wells, D.J., and Dickson, G. (2008). Codon and mRNA Sequence Optimization of Microdystrophin Transgenes Improves Expression and Physiological Outcome in Dystrophic mdx Mice Following AAV2/8 Gene Transfer. *Molecular Therapy* 16, 1825–1832.

- Freudenberg, F., Alttoa, A., and Reif, A. (2015). Neuronal nitric oxide synthase (NOS1) and its adaptor, NOS1AP, as a genetic risk factors for psychiatric disorders. *Genes, Brain and Behavior* 14, 46–63.
- Frontera, W.R., and Ochala, J. (2015). Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif Tissue Int* 96, 183–195.
- Fukao, A., Mishima, Y., Takizawa, N., Oka, S., Imataka, H., Pelletier, J., Sonenberg, N., Thoma, C., and Fujiwara, T. (2014). MicroRNAs Trigger Dissociation of eIF4AI and eIF4AII from Target mRNAs in Humans. *Molecular Cell* 56, 79–89.
- Gentil, C., Leturcq, F., Ben Yaou, R., Kaplan, J.-C., Laforet, P., Péniisson-Besnier, I., Espil-Taris, C., Voit, T., Garcia, L., and Piétri-Rouxel, F. (2012). Variable phenotype of del45-55 Becker patients correlated with nNOS μ mislocalization and RYR1 hypernitrosylation. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3449–3460.
- Gentil, C., Le Guiner, C., Falcone, S., Hogrel, J.-Y., Peccate, C., Lorain, S., Benkhelifa-Ziyyat, S., Guigand, L., Montus, M., Servais, L., et al. (2016). Dystrophin Threshold Level Necessary for Normalization of Neuronal Nitric Oxide Synthase, Inducible Nitric Oxide Synthase, and Ryanodine Receptor-Calcium Release Channel Type 1 Nitrosylation in Golden Retriever Muscular Dystrophy Dystrophinopathy. *Human Gene Therapy* 27, 712–726.
- Giliberto, F., Radic, C.P., Luce, L., Ferreiro, V., de Brasi, C., and Szijan, I. (2014). Symptomatic female carriers of Duchenne muscular dystrophy (DMD): genetic and clinical characterization. *J. Neurol. Sci.* 336, 36–41.
- Gingras, A.C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 913–963.
- Ginjaar, I.B., Kneppers, A.L., v d Meulen, J.D., Anderson, L.V., Bremmer-Bout, M., van Deutekom, J.C., Weegenaar, J., den Dunnen, J.T., and Bakker, E. (2000). Dystrophin nonsense mutation induces different levels of exon 29 skipping and leads to variable phenotypes within one BMD family. *Eur. J. Hum. Genet.* 8, 793–796.
- Gomez-Merino, E., and Bach, J.R. (2002). Duchenne muscular dystrophy: prolongation of life by noninvasive ventilation and mechanically assisted coughing. *Am J Phys Med Rehabil* 81, 411–415.
- Goyenvalle, A., Vulin, A., Fougousse, F., Leturcq, F., Kaplan, J.-C., Garcia, L., and Danos, O. (2004). Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 306, 1796–1799.
- Goyenvalle, A., and Davies, K.E. (2011). Engineering exon-skipping vectors expressing U7 snRNA constructs for Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Methods Mol. Biol.* 709, 179–196.
- Goyenvalle, A., Griffith, G., Babbs, A., El Andaloussi, S., Ezzat, K., Avril, A., Dugovic, B., Chaussonot, R., Ferry, A., Voit, T., et al. (2015). Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. *Nat. Med.* 21, 270–275.
- Greco, S., De Simone, M., Colussi, C., Zaccagnini, G., Fasanaro, P., Pescatori, M., Cardani, R., Perbellini, R., Isaia, E., Sale, P., et al. (2009). Common micro-RNA signature in skeletal

muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. *FASEB J.* 23, 3335–3346.

Grimson, A., Farh, K.K.-H., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., and Bartel, D.P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol. Cell* 27, 91–105.

Gücüyener, K., Ergenekon, E., Erbas, D., Pinarli, G., and Serdaroglu, A. (2000). The serum nitric oxide levels in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Brain and Development* 22, 181–183.

Guerron, A.D., Rawat, R., Sali, A., Spurney, C.F., Pistilli, E., Cha, H.-J., Pandey, G.S., Gernapudi, R., Francia, D., Farajian, V., et al. (2010). Functional and Molecular Effects of Arginine Butyrate and Prednisone on Muscle and Heart in the mdx Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS One* 5.

Guttman, M., and Rinn, J.L. (2012). Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature* 482, 339–346.

Guttman, M., Donaghey, J., Carey, B.W., Garber, M., Grenier, J.K., Munson, G., Young, G., Lucas, A.B., Ach, R., Bruhn, L., et al. (2011). lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature* 477, 295–300.

Ha, M., and Kim, V.N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 509–524.

Hafner, M., Jr, M.A., and Tuschl, T. (2011). New insights in the mechanism of microRNA-mediated target repression. *Nat Struct Mol Biol* 18, 1181–1182.

Hafner, P., Bonati, U., Rubino, D., Gocheva, V., Zumbrunn, T., Gueven, N., and Fischer, D. (2016). Treatment with l-citrulline and metformin in Duchenne muscular dystrophy: study protocol for a single-centre, randomised, placebo-controlled trial. *Trials* 17.

Hamer, P.W., McGeachie, J.M., Davies, M.J., and Grounds, M.D. (2002). Evans Blue Dye as an in vivo marker of myofibre damage: optimising parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. *J. Anat.* 200, 69–79.

Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H., and Kim, V.N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18, 3016–3027.

Hemmens, B., Goessler, W., Schmidt, K., and Mayer, B. (2000). Role of bound zinc in dimer stabilization but not enzyme activity of neuronal nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 275, 35786–35791.

Hnia, K., Gayraud, J., Hugon, G., Ramonatxo, M., De La Porte, S., Matecki, S., and Mornet, D. (2008). l-Arginine Decreases Inflammation and Modulates the Nuclear Factor- κ B/Matrix Metalloproteinase Cascade in Mdx Muscle Fibers. *Am J Pathol* 172, 1509–1519.

Hou, L., Xu, J., Li, H., Ou, J., Jiao, Y., Hu, C., and Wang, C. (2017). MiR-34c represses muscle development by forming a regulatory loop with Notch1. *Sci Rep* 7, 9346.

Horak, M., Novak, J., and Bienertova-Vasku, J. (2016). Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development. *Developmental Biology* 410, 1–13.

- Hu, J., Kong, M., Ye, Y., Hong, S., Cheng, L., and Jiang, L. (2014). Serum miR-206 and other muscle-specific microRNAs as non-invasive biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurochem.* *129*, 877–883.
- Huang, X., Poy, F., Zhang, R., Joachimiak, A., Sudol, M., and Eck, M.J. (2000). Structure of a WW domain containing fragment of dystrophin in complex with beta-dystroglycan. *Nat. Struct. Biol.* *7*, 634–638.
- Hutvagner, G., and Zamore, P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* *297*, 2056–2060.
- Ibraghimov-Beskrovnya, O., Ervasti, J.M., Leveille, C.J., Slaughter, C.A., Sernett, S.W., and Campbell, K.P. (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* *355*, 696–702.
- Ishikawa-Sakurai, M., Yoshida, M., Imamura, M., Davies, K.E., and Ozawa, E. (2004). ZZ domain is essentially required for the physiological binding of dystrophin and utrophin to beta-dystroglycan. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 693–702.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2010). THE MECHANISM OF EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION AND PRINCIPLES OF ITS REGULATION. *Nat Rev Mol Cell Biol* *11*, 113–127.
- Jakymiw, A., Pauley, K.M., Li, S., Ikeda, K., Lian, S., Eystathioy, T., Satoh, M., Fritzler, M.J., and Chan, E.K.L. (2007). The role of GW/P-bodies in RNA processing and silencing. *Journal of Cell Science* *120*, 1317–1323.
- Jeanson-Leh, L., Lameth, J., Krimi, S., Buisset, J., Amor, F., Le Guiner, C., Barthélémy, I., Servais, L., Blot, S., Voit, T., et al. (2014). Serum Profiling Identifies Novel Muscle miRNA and Cardiomyopathy-Related miRNA Biomarkers in Golden Retriever Muscular Dystrophy Dogs and Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *The American Journal of Pathology* *184*, 2885–2898.
- Kapp, L.D., and Lorsch, J.R. (2004). The Molecular Mechanics of Eukaryotic Translation. *Annu. Rev. Biochem.* *73*, 657–704.
- Karlsson, O., and Baccarelli, A.A. (2016). Environmental Health and Long Non-coding RNAs. *Curr Environ Health Rep* *3*, 178–187.
- Kellogg, D.L., McCammon, K.M., Hinchee-Rodriguez, K.S., Adamo, M.L., and Roman, L.J. (2017). Neuronal nitric oxide synthase mediates insulin- and oxidative stress-induced glucose uptake in skeletal muscle myotubes. *Free Radical Biology and Medicine* *110*, 261–269.
- Kerr, T.P., Sewry, C.A., Robb, S.A., and Roberts, R.G. (2001). Long mutant dystrophins and variable phenotypes: evasion of nonsense-mediated decay? *Hum. Genet.* *109*, 402–407.
- Ketting, R.F., Fischer, S.E.J., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., and Plasterk, R.H.A. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* *15*, 2654–2659.
- Kobayashi, Y.M., Rader, E.P., Crawford, R.W., Iyengar, N.K., Thedens, D.R., Faulkner, J.A., Parikh, S.V., Weiss, R.M., Chamberlain, J.S., Moore, S.A., et al. (2008). Sarcolemma-localized nNOS is required to maintain activity after mild exercise. *Nature* *456*, 511–515.

- Koenig, M., and Kunkel, L.M. (1990). Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J. Biol. Chem.* 265, 4560–4566.
- Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C., and Kunkel, L.M. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50, 509–517.
- Koenig, M., Monaco, A.P., and Kunkel, L.M. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53, 219–228.
- Koenig, M., Beggs, A.H., Moyer, M., Scherpf, S., Heindrich, K., Bettecken, T., Meng, G., Müller, C.R., Lindlöf, M., Kaariainen, H., et al. (1989). The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: Correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* 45, 498–506.
- Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K.G., Tuschl, T., Manoharan, M., and Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with “antagomirs.” *Nature* 438, 685–689.
- Kurreck, J., Wyszko, E., Gillen, C., and Erdmann, V.A. (2002). Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 30, 1911–1918.
- Lai, Y., Thomas, G.D., Yue, Y., Yang, H.T., Li, D., Long, C., Judge, L., Bostick, B., Chamberlain, J.S., Terjung, R.L., et al. (2009). Dystrophins carrying spectrin-like repeats 16 and 17 anchor nNOS to the sarcolemma and enhance exercise performance in a mouse model of muscular dystrophy. *J Clin Invest* 119, 624–635.
- Le Hir, M., Goyenvalle, A., Peccate, C., Précigout, G., Davies, K.E., Voit, T., Garcia, L., and Lorain, S. (2013). AAV genome loss from dystrophic mouse muscles during AAV-U7 snRNA-mediated exon-skipping therapy. *Mol. Ther.* 21, 1551–1558.
- Le Rumeur, E., Fichou, Y., Pottier, S., Gaboriau, F., Rondeau-Mouro, C., Vincent, M., Gallay, J., and Bondon, A. (2003). Interaction of dystrophin rod domain with membrane phospholipids. Evidence of a close proximity between tryptophan residues and lipids. *J. Biol. Chem.* 278, 5993–6001.
- Lebakken, C.S., Venzke, D.P., Hrstka, R.F., Consolino, C.M., Faulkner, J.A., Williamson, R.A., and Campbell, K.P. (2000). Sarcospan-Deficient Mice Maintain Normal Muscle Function. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1669–1677.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23, 4051–4060.
- Legardinier, S., Raguénès-Nicol, C., Tascon, C., Rocher, C., Hardy, S., Hubert, J.-F., and Le Rumeur, E. (2009). Mapping of the lipid-binding and stability properties of the central rod domain of human dystrophin. *J. Mol. Biol.* 389, 546–558.
- Leung, D.G., Herzka, D.A., Thompson, W.R., He, B., Bibat, G., Tennekoon, G., Russell, S.D., Schuleri, K.H., Lardo, A.C., Kass, D.A., et al. (2014). Sildenafil Does Not Improve Cardiomyopathy in Duchenne/Becker Muscular Dystrophy. *Ann Neurol* 76, 541–549.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15–20.

- Lim, K.R.Q., Maruyama, R., and Yokota, T. (2017). Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drug Des Devel Ther* 11, 533–545.
- Louboutin, J.P., Rouger, K., Tinsley, J.M., Halldorson, J., and Wilson, J.M. (2001). iNOS expression in dystrophinopathies can be reduced by somatic gene transfer of dystrophin or utrophin. *Mol Med* 7, 355–364.
- Lu, W.-T., Wilczynska, A., Smith, E., and Bushell, M. (2014). The diverse roles of the eIF4A family: you are the company you keep. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 166–172.
- MacLennan, D.H., Rice, W.J., and Green, N.M. (1997). The Mechanism of Ca²⁺ Transport by Sarco(Endo)plasmic Reticulum Ca²⁺-ATPases. *J. Biol. Chem.* 272, 28815–28818.
- Marieb, E.N., and Hoehn, K. (2007). *Human Anatomy & Physiology* (Pearson Education).
- Maroney, P.A., Yu, Y., Fisher, J., and Nilsen, T.W. (2006). Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol* 13, 1102–1107.
- Martin, E.A., Barresi, R., Byrne, B.J., Tsimerinov, E.I., Scott, B.L., Walker, A.E., Gurudevan, S.V., Anene, F., Elashoff, R.M., Thomas, G.D., et al. (2012). Tadalafil alleviates muscle ischemia in patients with Becker muscular dystrophy. *Sci Transl Med* 4, 162ra155.
- Matsuo, M., Awano, H., Matsumoto, M., Nagai, M., Kawaguchi, T., Zhang, Z., and Nishio, H. (2017). Dystrophin Dp116: A yet to Be Investigated Product of the Duchenne Muscular Dystrophy Gene. *Genes* 8, 251.
- Matthews, E., Brassington, R., Kuntzer, T., Jichi, F., and Manzur, A.Y. (2016). Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (John Wiley & Sons, Ltd), p.
- Meijer, H.A., Kong, Y.W., Lu, W.T., Wilczynska, A., Spriggs, R.V., Robinson, S.W., Godfrey, J.D., Willis, A.E., and Bushell, M. (2013). Translational Repression and eIF4A2 Activity Are Critical for MicroRNA-Mediated Gene Regulation. *Science* 340, 82–85.
- Meister, G., and Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343.
- Mokri, B., and Engel, A.G. (1975). Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. *Neurology* 25, 1111–1120.
- Molza, A.-E., Mangat, K., Le Rumeur, E., Hubert, J.-F., Menhart, N., and Delalande, O. (2015). Structural Basis of Neuronal Nitric-oxide Synthase Interaction with Dystrophin Repeats 16 and 17. *J Biol Chem* 290, 29531–29541.
- Monaco, A.P., Neve, R.L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C.J., Kurnit, D.M., and Kunkel, L.M. (1986). Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 323, 646–650.
- Monaco, A.P., Bertelson, C.J., Liechti-Gallati, S., Moser, H., and Kunkel, L.M. (1988). An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 2, 90–95.

- Muntoni, F., Torelli, S., and Ferlini, A. (2003). Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *The Lancet Neurology* 2, 731–740.
- Nathan, C., and Xie, Q.W. (1994). Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 269, 13725–13728.
- Nelson, C.E., Hakim, C.H., Ousterout, D.G., Thakore, P.I., Moreb, E.A., Rivera, R.M.C., Madhavan, S., Pan, X., Ran, F.A., Yan, W.X., et al. (2016). In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science* 351, 403–407.
- Nelson, M.D., Rader, F., Tang, X., Tavyev, J., Nelson, S.F., Miceli, M.C., Elashoff, R.M., Sweeney, H.L., and Victor, R.G. (2014). PDE5 inhibition alleviates functional muscle ischemia in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 82, 2085–2091.
- Nelson, M.D., Rosenberry, R., Barresi, R., Tsimerinov, E.I., Rader, F., Tang, X., Mason, O., Schwartz, A., Stabler, T., Shidban, S., et al. (2015). Sodium nitrate alleviates functional muscle ischaemia in patients with Becker muscular dystrophy. *J Physiol* 593, 5183–5200.
- Newey, S.E., Benson, M.A., Ponting, C.P., Davies, K.E., and Blake, D.J. (2000). Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex. *Curr. Biol.* 10, 1295–1298.
- Nguyen, H.X., and Tidball, J.G. (2003). Expression of a muscle-specific, nitric oxide synthase transgene prevents muscle membrane injury and reduces muscle inflammation during modified muscle use in mice. *J Physiol* 550, 347–356.
- Nicolas, A., Raguénès-Nicol, C., Yaou, R.B., Hir, S.A.-L., Chéron, A., Vié, V., Claustres, M., Leturcq, F., Delalande, O., Hubert, J.-F., et al. (2015). Becker muscular dystrophy severity is linked to the structure of dystrophin. *Human Molecular Genetics* 24, 1267–1279.
- Nielsen, C.B., Shomron, N., Sandberg, R., Hornstein, E., Kitzman, J., and Burge, C.B. (2007). Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA* 13, 1894–1910.
- Norwood, F.L., Sutherland-Smith, A.J., Keep, N.H., and Kendrick-Jones, J. (2000). The structure of the N-terminal actin-binding domain of human dystrophin and how mutations in this domain may cause Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Structure* 8, 481–491.
- Nottrott, S., Simard, M.J., and Richter, J.D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol* 13, 1108–1114.
- Ohlendieck, K., Matsumura, K., Ionasescu, V.V., Towbin, J.A., Bosch, E.P., Weinstein, S.L., Sernett, S.W., and Campbell, K.P. (1993). Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin-associated proteins in the sarcolemma. *Neurology* 43, 795–800.
- Ousterout, D.G., Kabadi, A.M., Thakore, P.I., Majoros, W.H., Reddy, T.E., and Gersbach, C.A. (2015). Multiplex CRISPR/Cas9-Based Genome Editing for Correction of Dystrophin Mutations that Cause Duchenne Muscular Dystrophy. *Nat Commun* 6, 6244.
- Pegoraro, E., Hoffman, E.P., Piva, L., Gavassini, B.F., Cagnin, S., Ermani, M., Bello, L., Soraru, G., Pacchioni, B., Bonifati, M.D., et al. (2011). SPP1 genotype is a determinant of disease severity in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 76, 219–226.
- Percival, J.M., Anderson, K.N.E., Gregorevic, P., Chamberlain, J.S., and Froehner, S.C. (2008). Functional Deficits in nNOS μ -Deficient Skeletal Muscle: Myopathy in nNOS Knock-out Mice. *PLoS ONE* 3.

- Percival, J.M., Anderson, K.N.E., Huang, P., Adams, M.E., and Froehner, S.C. (2010). Golgi and sarcolemmal neuronal NOS differentially regulate contraction-induced fatigue and vasoconstriction in exercising mouse skeletal muscle. *J Clin Invest* 120, 816–826.
- Péréon, Y., Mercier, S., and Magot, A. (2015). [Duchenne muscular dystrophy pathophysiology]. *Arch Pediatr* 22, 12S18-23.
- Peter, A.K., Cheng, H., Ross, R.S., Knowlton, K.U., and Chen, J. (2011). The costamere bridges sarcomeres to the sarcolemma in striated muscle. *Prog Pediatr Cardiol* 31, 83–88.
- Petersen, C.P., Bordeleau, M.-E., Pelletier, J., and Sharp, P.A. (2006). Short RNAs Repress Translation after Initiation in Mammalian Cells. *Molecular Cell* 21, 533–542.
- Petrof, B.J., Shrager, J.B., Stedman, H.H., Kelly, A.M., and Sweeney, H.L. (1993). Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *PNAS* 90, 3710–3714.
- Pfaff, J., and Meister, G. (2013). Argonaute and GW182 proteins: an effective alliance in gene silencing. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 855–860.
- Piétri-Rouxel, F., Gentil, C., Vassilopoulos, S., Baas, D., Mouisel, E., Ferry, A., Vignaud, A., Hourdé, C., Marty, I., Schaeffer, L., et al. (2010). DHPR α 1S subunit controls skeletal muscle mass and morphogenesis. *EMBO J* 29, 643–654.
- Place, R.F., Li, L.-C., Pookot, D., Noonan, E.J., and Dahiya, R. (2008). MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1608–1613.
- Quattrocchi, M., and Sampaolesi, M. (2015). The mesmiRizing complexity of microRNAs for striated muscle tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 88, 37–52.
- Quinn, J.J., and Chang, H.Y. (2016). Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet* 17, 47–62.
- Rando, T.A. (2001). The dystrophin–glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 24, 1575–1594.
- Rebeck, R.T., Karunasekara, Y., Board, P.G., Beard, N.A., Casarotto, M.G., and Dulhunty, A.F. (2014). Skeletal muscle excitation–contraction coupling: Who are the dancing partners? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 48, 28–38.
- Rebolledo, D.L., Kim, M.J., Whitehead, N.P., Adams, M.E., and Froehner, S.C. (2016). Sarcolemmal targeting of nNOS μ improves contractile function of mdx muscle. *Hum Mol Genet* 25, 158–166.
- Reilly, S.N., Liu, X., Carnicer, R., Recalde, A., Muszkiewicz, A., Jayaram, R., Carena, M.C., Wijesurendra, R., Stefanini, M., Surdo, N.C., et al. (2016). Up-regulation of miR-31 in human atrial fibrillation begets the arrhythmia by depleting dystrophin and neuronal nitric oxide synthase. *Sci Transl Med* 8, 340ra74.
- Reinig, A.M., Mirzaei, S., and Berlau, D.J. (2017). Advances in the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy: New and Emerging Pharmacotherapies. *Pharmacotherapy* 37, 492–499.
- Rentschler, S., Linn, H., Deininger, K., Bedford, M.T., Espanel, X., and Sudol, M. (2005).

The WW Domain of Dystrophin Requires EF-Hands Region to Interact with β -Dystroglycan. *Biological Chemistry* 380, 431–442.

Rinn, J.L., and Chang, H.Y. (2012). Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem* 81.

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. (2012). 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* 1, e39.

Rodríguez-Cruz, M., Sanchez, R., Escobar, R.E., Cruz-Guzmán, O. del R., López-Alarcón, M., Bernabe García, M., Coral-Vázquez, R., Matute, G., and Velázquez Wong, A.C. (2015). Evidence of Insulin Resistance and Other Metabolic Alterations in Boys with Duchenne or Becker Muscular Dystrophy. *Int J Endocrinol* 2015.

van Rooij, E., Quiat, D., Johnson, B.A., Sutherland, L.B., Qi, X., Richardson, J.A., Kelm, R.J., and Olson, E.N. (2009). A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell* 17, 662–673.

Sadoulet-Puccio, H.M., and Kunkel, L.M. (1996). Dystrophin and Its Isoforms. *Brain Pathology* 6, 25–35.

Schara, U., Mortier, null, and Mortier, W. (2001). Long-Term Steroid Therapy in Duchenne Muscular Dystrophy-Positive Results versus Side Effects. *J Clin Neuromuscul Dis* 2, 179–183.

Schwarz, D.S., Hutvágner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell* 115, 199–208.

Sempere, L.F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., and Ambros, V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* 5, R13.

Sha, Y., and Marshall, H.E. (2012). S-nitrosylation in the regulation of gene transcription. *Biochim Biophys Acta* 1820, 701–711.

Shen, H., Liu, T., Fu, L., Zhao, S., Fan, B., Cao, J., and Li, X. (2013). Identification of microRNAs involved in dexamethasone-induced muscle atrophy. *Mol. Cell. Biochem.* 381, 105–113.

Skuk, D. (2004). Myoblast transplantation for inherited myopathies: a clinical approach. *Expert Opinion on Biological Therapy* 4, 1871–1885.

Small, E.M., O'Rourke, J.R., Moresi, V., Sutherland, L.B., McAnally, J., Gerard, R.D., Richardson, J.A., and Olson, E.N. (2010). Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscle-enriched microRNA-486. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 4218–4223.

Stamler, J.S., and Meissner, G. (2001). Physiology of Nitric Oxide in Skeletal Muscle. *Physiological Reviews* 81, 209–237.

Stone, M.R., O'Neill, A., Catino, D., and Bloch, R.J. (2005). Specific interaction of the actin-binding domain of dystrophin with intermediate filaments containing keratin 19. *Mol. Biol. Cell* 16, 4280–4293.

- Stroynowska-Czerwinska, A., Fiszer, A., and Krzyzosiak, W.J. (2014). The panorama of miRNA-mediated mechanisms in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 71, 2253–2270.
- Surono, A., Takeshima, Y., Wibawa, T., Ikezawa, M., Nonaka, I., and Matsuo, M. (1999). Circular dystrophin RNAs consisting of exons that were skipped by alternative splicing. *Hum. Mol. Genet.* 8, 493–500.
- Sylvius, N., Bonne, G., Straatman, K., Reddy, T., Gant, T.W., and Shackleton, S. MicroRNA expression profiling in patients with lamin A/C-associated muscular dystrophy.
- Terrill, J.R., Radley-Crabb, H.G., Iwasaki, T., Lemckert, F.A., Arthur, P.G., and Grounds, M.D. (2013). Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. *FEBS J.* 280, 4149–4164.
- Thomas, G.D., Sander, M., Lau, K.S., Huang, P.L., Stull, J.T., and Victor, R.G. (1998). Impaired metabolic modulation of α -adrenergic vasoconstriction in dystrophin-deficient skeletal muscle. *PNAS* 95, 15090–15095.
- Tidball, J.G., and Wehling-Henricks, M. (2004). Expression of a NOS transgene in dystrophin-deficient muscle reduces muscle membrane damage without increasing the expression of membrane-associated cytoskeletal proteins. *Mol. Genet. Metab.* 82, 312–320.
- Tidball, J.G., and Wehling-Henricks, M. (2014). Nitric oxide synthase deficiency and the pathophysiology of muscular dystrophy. *J Physiol* 592, 4627–4638.
- Timpani, C.A., Trewin, A.J., Stojanovska, V., Robinson, A., Goodman, C.A., Nurgali, K., Betik, A.C., Stepto, N., Hayes, A., McConell, G.K., et al. (2017). Attempting to Compensate for Reduced Neuronal Nitric Oxide Synthase Protein with Nitrate Supplementation Cannot Overcome Metabolic Dysfunction but Rather Has Detrimental Effects in Dystrophin-Deficient mdx Muscle. *Neurotherapeutics* 14, 429–446.
- Tripathi, V., Ellis, J.D., Shen, Z., Song, D.Y., Pan, Q., Watt, A.T., Freier, S.M., Bennett, C.F., Sharma, A., Bubulya, P.A., et al. (2010). The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol. Cell* 39, 925–938.
- Ulitsky, I., and Bartel, D.P. (2013). lincRNAs: Genomics, Evolution, and Mechanisms. *Cell* 154, 26–46.
- Vallejo-Illarramendi, A., Toral-Ojeda, I., Aldanondo, G., and Munain, A.L. de (2014). Dysregulation of calcium homeostasis in muscular dystrophies. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 16.
- van der Ree, M.H., van der Meer, A.J., de Bruijne, J., Maan, R., van Vliet, A., Welzel, T.M., Zeuzem, S., Lawitz, E.J., Rodriguez-Torres, M., Kupcova, V., et al. (2014). Long-term safety and efficacy of microRNA-targeted therapy in chronic hepatitis C patients. *Antiviral Research* 111, 53–59.
- Varani, G. (1997). A cap for all occasions. *Structure* 5, 855–858.
- Vieira, N.M., Elvers, I., Alexander, M.S., Moreira, Y.B., Eran, A., Gomes, J.P., Marshall, J.L., Karlsson, E.K., Verjovski-Almeida, S., Lindblad-Toh, K., et al. (2015). Jagged 1 Rescues the Duchenne Muscular Dystrophy Phenotype. *Cell* 163, 1204–1213.

- Vignier, N., Amor, F., Fogel, P., Duvallet, A., Poupiot, J., Charrier, S., Arock, M., Montus, M., Nelson, I., Richard, I., et al. (2013). Distinctive Serum miRNA Profile in Mouse Models of Striated Muscular Pathologies. *PLOS ONE* 8, e55281.
- Vo, A.H., and McNally, E.M. (2015). Modifier genes and their effect on Duchenne muscular dystrophy. *Curr. Opin. Neurol.* 28, 528–534.
- Wang, Z. (2011). The guideline of the design and validation of MiRNA mimics. *Methods Mol. Biol.* 676, 211–223.
- Wang, B., Yanez, A., and Novina, C.D. (2008). MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 5343–5348.
- Wang, M., Liu, C., Su, Y., Zhang, K., Zhang, Y., Chen, M., Ge, M., Gu, L., Lu, T., Li, N., et al. (2017). miRNA-34c inhibits myoblasts proliferation by targeting YY1. *Cell Cycle* 16, 1661–1672.
- Wang, Y., Newton, D.C., Robb, G.B., Kau, C.-L., Miller, T.L., Cheung, A.H., Hall, A.V., VanDamme, S., Wilcox, J.N., and Marsden, P.A. (1999). RNA diversity has profound effects on the translation of neuronal nitric oxide synthase. *PNAS* 96, 12150–12155.
- Wehling, M., Spencer, M.J., and Tidball, J.G. (2001). A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. *J Cell Biol* 155, 123–132.
- Wells, S.E., Hillner, P.E., Vale, R.D., and Sachs, A.B. (1998). Circularization of mRNA by Eukaryotic Translation Initiation Factors. *Molecular Cell* 2, 135–140.
- Williamson, R.A., Henry, M.D., Daniels, K.J., Hrstka, R.F., Lee, J.C., Sunada, Y., Ibragimov-Beskrovnya, O., and Campbell, K.P. (1997). Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in *Dag1*-null mice. *Hum. Mol. Genet.* 6, 831–841.
- Witting, N., Kruuse, C., Nyhuus, B., Prahm, K.P., Citirak, G., Lundgaard, S.J., von Huth, S., Vejlstrup, N., Lindberg, U., Krag, T.O., et al. (2014). Effect of sildenafil on skeletal and cardiac muscle in Becker muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 76, 550–557.
- Wu, L., Fan, J., and Belasco, J.G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4034–4039.
- Xie, Q.W., Cho, H.J., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Ding, A., Troso, T., and Nathan, C. (1992). Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256, 225–228.
- Yamashita, K., Suzuki, A., Satoh, Y., Ide, M., Amano, Y., Masuda-Hirata, M., Hayashi, Y.K., Hamada, K., Ogata, K., and Ohno, S. (2010). The 8th and 9th tandem spectrin-like repeats of utrophin cooperatively form a functional unit to interact with polarity-regulating kinase PAR-1b. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 812–817.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17, 3011–3016.
- Young, C.S., Hicks, M.R., Ermolova, N.V., Nakano, H., Jan, M., Younesi, S., Karumbayaram, S., Kumagai-Cresse, C., Wang, D., Zack, J.A., et al. (2016). A single CRISPR-Cas9 deletion strategy that targets the majority of DMD patients restores dystrophin function in hiPSC-derived muscle cells. *Cell Stem Cell* 18, 533–540.

Younger, S.T., and Corey, D.R. (2011). Transcriptional regulation by miRNA mimics that target sequences downstream of gene termini. *Mol Biosyst* 7, 2383–2388.

Zaharieva, I.T., Calissano, M., Scoto, M., Preston, M., Cirak, S., Feng, L., Collins, J., Kole, R., Guglieri, M., Straub, V., et al. (2013). Dystromirs as Serum Biomarkers for Monitoring the Disease Severity in Duchenne Muscular Dystrophy. *PLOS ONE* 8, e80263.

Zekri, L., Huntzinger, E., Heimstädt, S., and Izaurralde, E. (2009). The Silencing Domain of GW182 Interacts with PABPC1 To Promote Translational Repression and Degradation of MicroRNA Targets and Is Required for Target Release. *Mol Cell Biol* 29, 6220–6231.