



HAL
open science

Neurobiologie des troubles cognitifs des modèles murins de la myopathie de Duchenne

Rémi Chaussenot

► **To cite this version:**

Rémi Chaussenot. Neurobiologie des troubles cognitifs des modèles murins de la myopathie de Duchenne. Neurobiologie. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS127 . tel-02426212

HAL Id: tel-02426212

<https://theses.hal.science/tel-02426212>

Submitted on 2 Jan 2020

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.

NNT : 2017SACLS127

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
"INSTITUT DES NEUROSCIENCES PARIS-SACLAY"

ECOLE DOCTORALE N°568
SIGNALISATIONS ET RESEAUX INTEGRATIFS EN BIOLOGIE (BIOSIGNE)
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Par

Mr Rémi Chaussonot

*Neurobiologie des troubles cognitifs des modèles murins de la
myopathie de Duchenne*

Thèse présentée et soutenue à « Orsay », le « 09/06/2017 » :

Composition du Jury :

Mme Granon Sylvie	Pr, Institut des Neurosciences Paris-Saclay	Présidente
Mr Coutureau Etienne	DR2, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine	Rapporteur
Mr Rivier François	Pr, Centre de Référence Maladies Neuromusculaires	Rapporteur
Mme Nosten-Bertrand Marika	CR1, Institut du Fer à Moulin	Examinatrice
Mr Vaillend Cyrille	CR1, Institut des Neurosciences Paris-Saclay	Directeur de thèse

**Neurobiologie des troubles
cognitifs des modèles
murins de la myopathie de
Duchenne**

À Henri Ollivro

Remerciements

La science, à l'image de l'Internet passé et de ce que devrait être le monde, se base sur la *collaboration*. Cette thèse n'aurait pas été possible sans vous :

Les membres du jury qui ont accepté d'examiner ce travail. Merci à Marika et Etienne pour leurs conseils précieux lors de mon oral de mi-parcours de thèse et sur ce manuscrit. Merci à Sylvie qui m'a apporté de précieux conseils quand j'en avais le plus besoin. Et merci à François d'accepter de prendre part au jury, ton expertise clinique apporte énormément à cette thèse.

A Roseline, qui est la raison de mon attrait pour le comportement murin et le déclencheur de mon envie de faire une thèse, suite à ses cours en Master 1.

A Cyrille qui a dirigé ma thèse dans la continuité du stage de Master 2. Excellent scientifique, tu es également un très bon enseignant, un passionné et une personne dont j'apprécie les qualités humaines. Tu as su m'impliquer dans des collaborations pluridisciplinaires et me soutenir. J'admire énormément la personne que tu es, pas pour ce qu'elle est, mais pour la quantité de travail que tu as donné pour en arriver là. Tu ressembles à mon « chercheur idéal », alors que le milieu scientifique est loin de l'être, vu le manque récurrent de crédits.

A l'AFM, l'ANR, l'IFR 144, l'ED 419 et Antonie Moradel du service handicap pour avoir financés ces travaux. A Serge Laroche pour m'avoir accueilli dans son laboratoire du CNPS.

A mes collaborateurs, particulièrement l'équipe de zootechnie (Calette, Nathalie) qui ont pris soin des animaux avant mes expérimentations et sans qui mon travail n'aurait été possible. Au secrétariat, aussi, parce que l'administratif reste encore un mystère non-élucidé pour moi et vous avez été d'une grande aide quand je me retrouvais face à un formulaire à remplir. A Boris, Bruno et Chloé pour votre aide informatique. Une pensée particulière pour Laurent et Michael de l'Ecole Doctorale, qui m'ont soutenu sans faille toutes ces années. Aux étudiants qui ont participé à mon projet (Benoît et Marie-Ange).

A Jean-Marc, qui m'a suivi de mes premières expérimentations de M2, jusqu'à la fin. Tu as joué le rôle de mon directeur de thèse de cœur, à toujours être présent, surtout quand ça n'allait pas avec Cyrille car j'avais fait des erreurs. Merci pour ta présence.

A Pascale, Jean-Louis et Annie Le Gal, pour vos précieux conseils et discussions tardives dans les moments de doute.

Aux équipes qui m'ont « prise sous leurs ailes », de la Communication Acoustique (Thierry, Isabelle, Hélène, Fanny, Chloé, Olivier et tous vos étudiants dont Maxime, Juliette et Clément)

pour le plaisir, à celle de Jean-Vianney, Sandrine et Véronique (et Nat que j'ai dérangé dans son bureau) lors de mon début d'écriture quand je cherchais un endroit calme pour écrire.

A Morgane et Odile, du premier étage. J'ai géré mes interactions professionnelles comme tout bon politicien, en ratissant large, et même si vous faites de la biologie moléculaire, vous m'avez aidé. Comme à peu près tout le monde dans le bâtiment, en fait. Merci.

A mes camarades de bureau (Alexandra, Alexandra, Alexandra, Sumen et tous les passagers du « bureau des étudiants »), qui m'ont supporté pendant 4 ans. Surtout Alexandra, qui est, je cite : « la plus relou des co-bureau ! »¹.

A ma famille, incluant Etienne et Florian, qui m'ont soutenu moralement et financièrement tout au long de la thèse. Vous avez été présents dans mes moments les plus sombres et je vous en suis reconnaissant. Vous êtes mon phare dans la nuit noire. A mon grand-père, avec qui je n'ai pas partagé son dernier Noël car « la thèse », ce sera mon seul regret de cette aventure, j'aurai dû être là, finalement, j'avais largement le temps de t'en consacrer.

Aux associations où je suis impliqué (Un Sourire pour l'Espoir, Archers de Villebon, Wake Up), parce qu'avoir eu la chance de travailler sur autre chose que la thèse le soir, c'était salutaire.

A Twitter, lieu où les doctorants se rassemblent et se soutiennent. Pensée particulière pour @mixlamalice avec qui on a décortiqué tous les budgets de l'ANR, pour mettre en évidence comment cet organisme s'était perdu en chemin². A @PhDelirium qui m'a empêché d'abandonner, plus d'une fois. Et @fxcoudert pour tes précieux conseils sur macOS.

A Scrivener (où j'ai rédigé cette thèse), Juris-M (gestionnaire bibliographique), MATLAB (où j'ai développé toutes mes procédures d'analyses statistiques, qui seront mis en open-source à la fin de la thèse). A la musique et au Valmer. Ma maman m'a toujours dit qu'il fallait les bons outils pour travailler et clairement, ce sont des bons outils.

Je n'oublie pas le moi d'hier aussi. Tu es venu à la science pour comprendre ton hémiplégie, six ans plus tard, tu as compris que l'on ne la comprend pas. Au toi qui a découvert dans la littérature ton TSA en M2, à ton errance émotionnelle en début de thèse, à ta volonté de corriger ton corps qui t'a poussé en Espagne sur la table d'opération d'un chirurgien qui ne parlait que Russe. Aux personnes avec qui tu as rompu le contact, parce qu'après tout, parfois, tu préfères fuir pour cause d'incompréhension. Au contact de tous ces gens, tu as évolué, en bien. Tu as passé un moment difficile, sans jamais être au niveau visé, et on ne va pas se mentir : ce n'est le commencement. Mais tu as du *soutien* et c'est inestimable à tes yeux.

1. https://twitter.com/alexandra_gros/status/849612253515132929

2. <https://twitter.com/mixlamalice/status/627802411667714048>

Avant-propos

I. Publications à comité de lecture

Goyenvallée A., Griffith G., Babbs A., El Andaloussi S., Ezzat K., Avril A., Dugovic B., **Chaussonot R.**, Ferry A., Voit T., Amthor H., Bühr C., Schürch S., Wood MJ., Davies KE., Vaillend C., Leumann C., Garcia L. (2015) Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. *Nature Medicine*, **21**, 270-5.

Chaussonot R., Edeline JM., Le Bec B., El Massioui N., Laroche S., Vaillend C. (2015) Cognitive dysfunction in the dystrophin-deficient mouse model of Duchenne muscular dystrophy: A reappraisal from sensory to executive processes. *Neurobiology of Learning and Memory*, **124**, 111-22.

Vaillend C. and **Chaussonot R.** (2017) Relationships linking emotional, motor, cognitive and GABAergic dysfunctions in dystrophin-deficient mdx mice. *Human Molecular Genetics*, **26**, 1041-55.

Chaussonot R., Amar M., Vaillend C. A selective inactivation of Dp71-dystrophin promoter impairs executive functions and prefrontal cortex excitation-inhibition balance. (*en preparation*)

II. Communications orales

Chaussonot R. (2013) *Neurobiologie des troubles cognitifs des modèles murins de la myopathie de Duchenne*. Université Paris-Sud XI, Orsay, France

Chaussonot R. (2015) *Phénotype comportemental de la souris Dp71-null*. Université Paris-Sud XI, Orsay, France

Chaussonot R. (2015) *Le handicap est-il un frein à la vie ?* Maison De L'Espérance, Paris, France

Chaussonot R. (2016) *Creation of a statistical routine for behavioral analysis with MATLAB*. Université Paris-Sud XI, Orsay, France

III. Communications affichées

Chaussonot R., Laroche S., Vaillend C. (2013) *A behavioral characterization of executive functions in the dystrophin-deficient mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy*. 11^{ième} forum de la Société des Neurosciences Françaises, Lyon, France.

Chaussonot R., Edeline J-M., Laroche S., Vaillend C. (2013) *Executive functions in mice lacking the mental retardation-associated dystrophin-Dp71 protein*. Colloque de clôture de l'IFR144 NeuroSud Paris, Gif-sur-Yvette.

Chaussonot R., Laroche S., Vaillend C. (2013) *A behavioral characterization of executive functions in the dystrophin-deficient mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy*. ED419 BIO-SIGNE, Université Paris-Sud XI, Kremlin-Bicêtre, France.

Chaussonot R., Goyenvallé A., Griffith G., Leumann C., Dugovic B., Laroche S., Garcia L., Vaillend C. (2014) *Major role of dystrophin in fear responses : phenotypic characterization and behavioral rescue by antisens-mediated exon skipping in the mdx mouse*. FENS-0895. 9^{ième} Forum FENS, Milan.

Chaussonot R., Goyenvallé A., Griffith G., Leumann C., Dugovic B., Laroche S., Garcia L., Vaillend C. (2014) *Major role of dystrophin in fear responses : phenotypic characterization and behavioral rescue by antisens-mediated exon skipping in the mdx mouse*. ED419 BIO-SIGNE, Université Paris-Sud XI, Kremlin-Bicêtre, France.

IV. Enseignement

2011 - 2012

Enseignement de C2i. Université Paris-Saclay, Orsay, France

Niveau L1 – Cours magistraux et pratique - 64h/an

Réseaux / Internet / Web – Droits intellectuels sur Internet - PréAO –

Développement HTML/CSS – Sécurité numérique –

Identité numérique – Travail collaboratif –

Utilisation avancée des moteurs de recherche –

Recherche bibliographique

2011 - 2014

Enseignement de Physiologie Animale. Université Paris-Saclay, Orsay, France.

Niveau L2 - Travaux Pratique - 64h/an

Physiologie gustative

Potentiel membranaire

Table des matières

REMERCIEMENTS	7
AVANT-PROPOS	9
I. PUBLICATIONS À COMITÉ DE LECTURE	9
II. COMMUNICATIONS ORALES	9
III. COMMUNICATIONS AFFICHÉES	10
IV. ENSEIGNEMENT	10
TABLE DES MATIERES	11
LISTE DES ILLUSTRATIONS	13
LISTE DES ANNEXES	15
LISTE DES ABREVIATIONS	17
INTRODUCTION	19
I. LE SYNDROME DE MYOPATHIE DE DUCHENNE	21
1. <i>Une pathologie musculaire évolutive</i>	21
2. <i>Des atteintes centrales non évolutives</i>	24
3. <i>Une variabilité phénotypique liée à la complexité du gène dmd</i>	34
II. LES DYSTROPHINES ET LEURS PARTENAIRES	42
1. <i>La famille des dystrophines</i>	42
2. <i>Les complexes protéique et glycoprotéique associés aux dystrophines</i>	49
3. <i>Conclusion</i>	52
III. LES MODÈLES EXPÉRIMENTAUX.....	53
1. <i>Présentation générale</i>	53
2. <i>La souris mdx : modèle des altérations communes à tous les patients ?</i>	53
3. <i>La souris Dp71-null : modèle du subphénotype de déficience intellectuelle ?</i>	58
4. <i>Conclusion</i>	60
IV. OBJECTIFS	61
CHAPITRE I	63
ROLE DE LA DYSTROPHINE COMPLETE (DP427)	63
I. PERCEPTION, APPRENTISSAGE ASSOCIATIF ET FONCTIONS EXÉCUTIVES	65
1. <i>Contexte de l'étude</i>	65
2. <i>Méthodologie</i>	65
3. <i>Résultats</i>	66
4. <i>Conclusion</i>	66
<i>Article n°1 : Cognitive dysfunction in the dystrophin-deficient mouse model of Duchenne muscular dystrophy: A reappraisal from sensory to executive processes</i>	69
II. EMOTIONS, FONCTIONS MOTRICES, COGNITION ET DYSFONCTIONS GABAÉRIQUES	83
1. <i>Contexte de l'étude</i>	83
2. <i>Méthodologie</i>	83
3. <i>Résultats</i>	84
4. <i>Conclusion</i>	85
<i>Article n°2 : Relationships linking emotional, motor, cognitive and GABAergic dysfunctions in dystrophin-deficient mdx mice</i>	87
CHAPITRE II	105
ROLE DE LA DYSTROPHINE COURTE (DP71)	105
I. FILTRAGE SENSORIEL ET FONCTIONS EXÉCUTIVES.....	107
1. <i>Contexte de l'étude</i>	107
2. <i>Méthodologie</i>	107
3. <i>Résultats</i>	108
4. <i>Conclusion</i>	109
<i>Article n°3 : A selective inactivation of Dp71-dystrophin promoter impairs executive functions and prefrontal cortex excitation-inhibition balance</i>	111

II. PERCEPTION ET MÉMOIRE ÉMOTIONNELLE : RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES	144
1. <i>Contexte de l'étude</i>	144
2. <i>Méthodologie</i>	144
3. <i>Résultats</i>	148
4. <i>Discussion</i>	150
CHAPITRE III	153
RESTAURATION DE LA DP427 PAR THERAPIE GENIQUE	153
I. CONTEXTE DE L'ÉTUDE	155
II. MÉTHODOLOGIE	155
III. RÉSULTATS	156
IV. CONCLUSION	157
ARTICLE N°4	159
FUNCTIONAL CORRECTION IN MOUSE MODELS OF MUSCULAR DYSTROPHY USING EXON-SKIPPING TRICYCLO-DNA OLIGOMERS	159
DISCUSSION	179
I. LA DYSTROPHINE DP427	182
II. LA DYSTROPHINE DP71	184
III. PERSPECTIVES THÉRAPEUTIQUES	185
ANNEXES	189
I. ANNEXE 1 : ÉCHELLES DE BAYLEY DU DÉVELOPPEMENT DE L'ENFANT	191
II. ANNEXE 2 : QUOTIENT INTELLECTUEL (WECHSLER INTELLIGENCE SCALE FOR CHILDREN)	193
III. ANNEXE 3 : DU GÈNE À LA PROTÉINE	195
IV. ANNEXE 4 : LA DP427L : HISTOIRE D'UNE FAUSSE DÉTECTION	197
BIBLIOGRAPHIE	199
RESUMES ET MOTS CLEFS	215
1. <i>Résumé de la thèse en français</i>	217
2. <i>Résumé de la thèse en anglais</i>	218
3. <i>Résumé de thèse vulgarisé pour le grand public en français</i>	219
4. <i>Résumé de thèse vulgarisé pour le grand public en anglais</i>	219
5. <i>Mots clés en français</i>	219
6. <i>Mots clés en Anglais</i>	219

Liste des illustrations

FIGURE 1 – PATIENT DMD REPRESENTE PAR LE DR. DUCHENNE (DUCHENNE, 1868)	21
FIGURE 2 – FRISE CHRONOLOGIQUE DES PREMIERES DESCRIPTIONS DE LA MYOPATHIE	22
FIGURE 3 – DIFFERENTS PRODUITS DU GENE <i>DMD</i>	35
FIGURE 4 - EFFET DE LA PERTE CUMULATIVE DES DYSTROPHINES SUR LE FSIQ	38
FIGURE 5 - FSIQ EN FONCTION DES DYSTROPHINES AFFECTEES.	39
FIGURE 6 – INCIDENCE DE ADHD EN FONCTION DE LA MUTATION	40
FIGURE 7 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA DYSTROPHINE ET DU COMPLEXE GLYCOPROTEIQUE ASSOCIE AUX DYSTROPHINES (DYSTROPHIN GLYCOPROTEIN COMPLEX, DGC) DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE.....	42
FIGURE 8 - LA DP427 DANS LES SYNAPSES INHIBITRICES GABAERGIQUES.....	44
FIGURE 9 - DGC ASSOCIE A LA DP71 DANS LES ASTROCYTES PERIVASCULAIRES	47
FIGURE 10 - DGC ASSOCIE A LA DP71 DANS LA SYNAPSE EXCITATRICE : MODELE DE TRAVAIL	47
FIGURE 11 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES ISOFORMES DE LA DP71	48
FIGURE 12 - SITES DE MUTATION ET DYSTROPHINES AFFECTEES DANS DIFFERENTES LIGNEES <i>MDX</i>	54
FIGURE 13 - REPONSES AUDITIVES DU TRONC CEREBRAL (AUDITORY BRAINSTEM RESPONSES, ABR) ENREGISTREES CHEZ LES SOURIS WT ET DP71-NULL.....	148
FIGURE 14 - APPRENTISSAGE ASSOCIATIF ET MEMOIRE DE PEUR CHEZ LES SOURIS WT ET DP71-NULL.	149
FIGURE 15 – DOMAINES DE LA DYSTROPHINE	195
FIGURE 16 – DIFFERENTS PRODUITS DU GENE <i>DMD</i>	196

Liste des annexes

I. ANNEXE 1 : ÉCHELLES DE BAYLEY DU DEVELOPPEMENT DE L'ENFANT.....	191
II. ANNEXE 2 : QUOTIENT INTELLECTUEL (WECHSLER INTELLIGENCE SCALE FOR CHILDREN)	193
III. ANNEXE 3 : DU GENE A LA PROTEINE	195
IV. ANNEXE 4 : LA DP427L : HISTOIRE D'UNE FAUSSE DETECTION	197

Liste des abréviations

- 2'OMe: 2'-O-methyl oligoribonucléotides modifié avec un squelette phosphorothioate uniforme, 155
- 3Di: Developmental, Dimensional and Diagnostic Interview, 33
- ABR: Auditory Brainstem Responses, 148
- ADHD: Attention Deficit Hyperactivity Disorder, 27
- ADI: Autisme Diagnostic Interview, 33
- ADN: Acide désoxyribonucléique, 34
- ADOS: Autism Diagnostic Observation Schedule, 33
- AMPA: Acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique, 46
- ANOVA: Analyse de la variance, 146
- AQP4: Aquaporine 4, 47
- ARJ: Arthrite Rhumatoïde Juvénile, 28
- ARNm: Acide Ribonucléique messenger, 36
- BMD: Dystrophie musculaire de Becker, 39
- BSID: Bayley Scales of Infant and Toddler Development, 191
- CBCL: Child Behavior Checklist, 31
- CRA: Centre Ressource Autisme, 33
- dB SPL: Decibel in Sound Pressure Level, 145
- DGC: Dystrophin Glycoprotein Complex, 46
- dKO*: double knock-out, 155
- DMD: Dystrophie Musculaire de Duchenne, 21
- DNMTP: Delayed Non-Matching To Place, 108
- Dp427: Dystrophin Protein of 427 kDa, 35
- Dp71: Dystrophin protein of 71 kDa, 27
- DSM: Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux, 27
- dystroglycane: Dystrophin-associated glycoproteins, 50
- ENU: N-ethyl-N-nitrosourea, 54
- ERG: Electrorétinogramme, 27
- FSIQ: Full Scale Intelligence Quotient, 25
- GABA: Acide γ -aminobutyrique, 33
- gaboxadol *Voir* THIP
- HSF1: Heat shock factor 1, 48
- kb: kilobases, 34
- kDa: kilodalton, 43
- kHz: kiloHertz, 83
- LTP: Potentialisation à long terme, 57
- MEC: Matrice extracellulaire, 50
- NBQX: 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzof[quinoxaline-2,3-dione, 108
- NLGN: Neuroligines, 47
- NMDA: Acide N-méthyl-D-aspartique, 46
- nNOS: Neuronal nitric oxide synthase, 52
- NRX: Neurexines, 47

PIQ: Performance Intelligence Quotient, 25
PMO: Oligonucléotides morpholinos phosphorodiamidate, 155
PSD95: Postsynaptic Density Protein 95, 33
QI: Quotient Intellectuel, 25
SC: Stimulus Conditionné, 146
SCDC: Social and Communication Disorders Checklist, 41
SI: Stimulus Inconditionné, 146
SMA: Amyotrophie Spinale, 28
SNC: Système nerveux central, 50
SPD: Sensory Processing Disorder, 26
tcDNA: ADN tri-cyclique, 155
THIP: 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo(5,4-c)pyridin-3-ol, 84
TOC: Troubles Obsessionnels Compulsifs, 27
UTR: Untranslated Transcribed Region, 38
VIQ: Verbal Intelligence Quotient, 25
WAIS: Wechsler Adult Intelligence Scale, 25
WISC: Wechsler Intelligent Scale for Children, 25
WPPSI: Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence, 25
WT: Wild Type, 149

Introduction

I. Le syndrome de myopathie de Duchenne

1. Une pathologie musculaire évolutive

a. Découvertes historiques de la myopathie

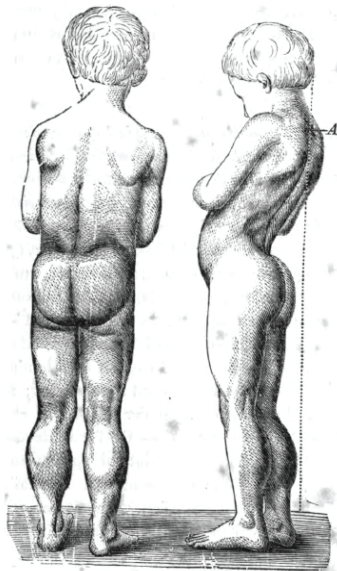


Figure 1 – Patient DMD représenté par le Dr. Duchenne
(Duchenne, 1868)

Le Dr Duchenne dit de ce garçon âgé de 7 ans, atteint de paralysie pseudo-hypertrophique (nommée de nos jours, dystrophie musculaire de Duchenne, DMD) que ses muscles moteurs des membres inférieurs et les spinaux lombaires sont démesurément développés, contrastant avec la maigreur des membres supérieurs. Sur la vue de profil, Duchenne désire montrer l'ensellure qui se produit pendant la station et la marche.

La première description de la dystrophie musculaire par le Dr. Guillaume Duchenne de Boulogne a eu lieu en 1861. Dans son ouvrage *De l'électrisation localisée et de son application à la pathologie et à la thérapeutique* (Duchenne, 1861), il aborde aux pages 354 à 356, le cas de Joseph Sarrazin, âgé de neuf ans dont « *[les muscles] étaient fermes, comme hypertrophiés* ». C'est en 1868 qu'il décrit plus en détail la maladie dans son ouvrage *De la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique* (Duchenne, 1868) avec l'exposé de 13 cas de jeunes garçons présentant le phénotype musculaire de ce que l'on appelle aujourd'hui, la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) ou myopathie de Duchenne.

Ce qui est moins connu, c'est que le Dr. Gowers en 1879, dans son article *Pseudo-hypertrophic muscular paralysis – a clinical lecture* soulève la possibilité que deux frères myopathes aient été décrit par Coste et Gioja dès 1838 dans le journal *Annali Clinici dell'Ospedale degli Incurabili di Napoli*. Cette information est en vérité fautive, comme rapporté par le Professeur Giovanni Nigro de l'Université de Naples en 1986 qui révèle que le cas de ces deux frères fut décrit par le Professeur G. Conte (et non Coste) avec l'aide du Docteur L. Gioja dans un article daté de 1836. Nigro a publié en 2010 *One-hundred-seventy-five years of Neapolitan contributions to the fight against the muscular diseases* qui revient en détail sur cet historique Napolitain de la myopathie qui prend place trente ans avant la description du Dr. Duchenne. Les noms de Conte et Gioja ne marquent pas l'Histoire, car à leur époque, beaucoup étaient persuadés qu'ils décrivaient un cas de tuberculose. De nos jours, leur description ne laisse aucun doute, il s'agit bel et bien d'une

forme de dystrophie, aujourd'hui appelée myopathie de Becker, plus bénigne que celle décrite par Duchenne.

On citera également l'année 1847, où R. Partridge présenta à la *Pathological Society of London* le cas d'un garçon qui présente tous les symptômes de la myopathie de Duchenne. C'est également en 1847, que le Docteur W. J. Little, décrit le cas de deux garçons qui présentent le phénotype de la myopathie de Duchenne. Quatre années plus tard, un autre nom apparaît, celui du Docteur Edward Meryon qui a effectué ses études entre Paris et Londres. Dans une communication adressée à la *Royal Medical and Chirurgical Society* en décembre 1851 (puis publiée dans *Transactions of the Society*, l'année suivante), il décrit huit garçons de trois familles différentes. Meryon fut impressionné par la nature familiale de cette pathologie et la prédilection qu'elle a à toucher les garçons. Dans son livre *Practical and pathological researches on the various forms of paralysis*, publié en 1864, il détaille une famille où quatre cousins sont affectés, transmission réalisée par trois sœurs. Il s'intéressa surtout à la pathologie musculaire.

Mais l'originalité du travail du Dr. Duchenne est de mettre en lumière un aspect particulier de la myopathie. Dès 1861, il écrira que Joseph Sarazin, son premier cas, présente une «*intelligence obtuse et la parole difficile*», complétant en 1868 dans son chapitre *Quelques autres phénomènes morbides* : «*la parole tardive [et une] intelligence obtuse, quelquefois jusqu'à l'idiotie* ». Edward Meryon, contemporain du Dr. Duchenne et au fait de ses recherches, publiera un article spécifiant son désaccord concernant cet aspect cognitif, arguant qu'il n'a trouvé aucun signe d'anomalie dans la moelle osseuse des patients myopathes (Emery et Emery, 1993).

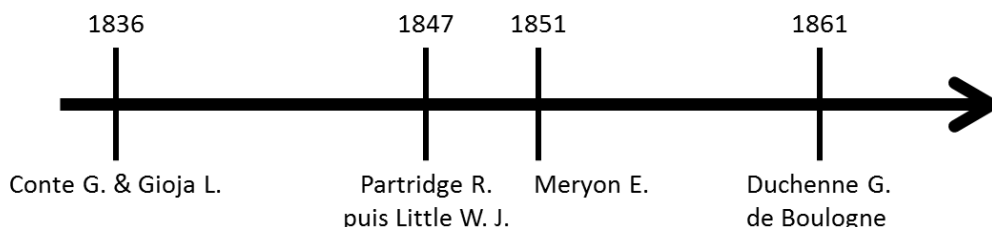


Figure 2 – Frise chronologique des premières descriptions de la myopathie

Nous devons donc la première description d'une myopathie à Conte et Gioja, mais l'Histoire retiendra le nom du Dr. Duchenne, déjà reconnu pour ses travaux sur le faradisme³ et ses contributions à la compréhension des maladies musculaires. Ce fut également, dans une moindre mesure, le premier à soulever les altérations cognitives des patients, qui font l'objet de ce travail de recherche.

b. Données épidémiologiques descriptives et évaluatives

L'incidence de cette pathologie est estimée à 1 cas sur 3 600 nouveaux nés masculins d'après une récente méta-analyse de Mah *et al.* en 2014. La même année, Theodom *et al.*

3. Le faradisme correspond à l'utilisation de courant visant à stimuler les muscles et les nerfs.

revoient à la baisse cette incidence en utilisant une méthodologie différente de méta-analyse, rappelant que le décès précoce des patients rend difficile l'estimation exacte de l'incidence de la myopathie de Duchenne. Ces deux études permettent, de plus, de confirmer celle de Bortolini et Zatz (1987) qui mettait en évidence une incidence similaire de la maladie sur les populations Européennes, Américaines, Arabes et Asiatiques. Landfeldt *et al.*, en 2014, ont publié une étude visant à quantifier ce coût en Allemagne, Italie, Royaume Unis et Etats Unis d'Amérique: il est de 80 k€ à 120 k€ par patient et par an. En France, 150 à 200 garçons nouveau-nés sont atteints de la myopathie de Duchenne par an, et on estime à 2 500 le nombre total de patients. Ceci représente un budget compris entre 200 et 300 millions d'euros dépensés chaque année en infrastructure de soin. La myopathie de Duchenne est donc certes une maladie rare, mais néanmoins une maladie coûteuse, en termes de vies, d'économie et de temps (personnel de soins).

c. Dégénérescence musculaire

L'enfant pourra présenter un certain retard du développement moteur, la moitié des enfants atteints de cette maladie ne marchant pas avant l'âge de 18 mois (Gardner-Medwin, *et al.*, 1978), mais cela est commun à d'autres pathologies beaucoup plus communes et tous les parents ne vont pas nécessairement s'en inquiéter, pensant que chaque enfant évolue à une vitesse différente. Entre trois et six ans, on remarque une maladresse de l'enfant lors d'activités motrices ; il tombe souvent et arrive difficilement à courir. Apparaît également une hypertrophie des mollets. Le diagnostic est souvent posé durant cette période. Les muscles des épaules et du bassin sont les premiers touchés. Pour arriver à marcher, l'enfant se creuse le dos, il a tendance à marcher sur la pointe des pieds et à projeter ses épaules en arrière. Il éprouve aussi des difficultés à se relever. Entre 7 et 10 ans, il perd progressivement la capacité de se relever seul du sol, de monter les escaliers et de se relever d'une chaise. De plus, il chute souvent. La perte de la marche survient vers l'âge de 10 ans \pm 3 ans ; c'est alors que surviennent des difficultés à maintenir la station assise du fait de l'atteinte des muscles du tronc.

A partir de ce moment, on peut définir quatre grandes altérations : les problèmes vitaux qui débutent vers l'âge de 11 ans par une forte altération des muscles respiratoires et du tronc, entraînant une perte de la capacité respiratoire. Ensuite, les problèmes cardiaques vont se traduire par une insuffisance cardiaque qui rend difficile la circulation sanguine et entraîne des palpitations. Puis s'ajouteront des problèmes nutritionnels liés aux difficultés à avaler et aux problèmes de déglutition (risque de fausse-route) dus à l'atteinte des muscles du tronc qui sont à l'origine d'une réduction de l'alimentation pouvant entraîner des carences nutritionnelles. L'enfant présente aussi de plus en plus de difficulté à porter la main à la bouche pour manger. Enfin, les problèmes orthopédiques se traduisent par des déformations articulaires, liées aux déséquilibres des forces musculaires. C'est ainsi que l'on peut observer une légère flexion de la tête vers l'arrière, compensée par une flexion du tronc vers l'avant, ou assister à une déformation de la mâchoire gênant la fermeture de la bouche et de la mastication. De plus, quand l'enfant est confiné dans un fauteuil roulant, certaines déformations ou rétractions apparaissent et une scoliose progressive survient chez 65% d'entre eux. C'est à ce moment-là que l'on peut avoir recours à la chirurgie orthopédique, en particulier l'arthrodèse du rachis pour permettre un meilleur maintien en

position assise et prévenir l'aggravation des troubles respiratoires. L'issue fatale de la DMD repose sur une atteinte des muscles respiratoires et cardiaques qui vont arrêter de fonctionner vers l'âge de 18 ans si aucun traitement n'est mis en œuvre (Van Ruiten *et al.*, 2016). Cependant, grâce aux progrès de la médecine, les patients peuvent maintenant espérer vivre jusqu'à 30 ans et plus (Eagle *et al.*, 2002). *Actuellement, aucun traitement curatif n'existe pour la myopathie de Duchenne.* Des méthodes non-curatives visant à retarder l'évolution de la maladie peuvent être mises en œuvre, comme le décrit cette étude brésilienne (Rodrigues *et al.*, 2009) qui démontre une amélioration respiratoire par la pratique du yoga, ou une autre étude (Bruggen *et al.*, 2015) qui utilise le chewing-gum pour retarder l'atteinte des muscles masticateurs. Les deux traitements les plus reconnus et efficaces sont l'utilisation de la ventilation nocturne qui retarde de 6 ans l'âge du décès (Bruggen *et al.*, 2015 ; Simonds *et al.*, 1998), et les traitements à base de stéroïdes (glucocorticoïdes, Rutter *et al.*, 2012) qui permettent de préserver les fonctions cardiaque et pulmonaire durant l'adolescence et retardent les formes sévères de scoliose. Les effets secondaires des stéroïdes, principalement des changements d'humeurs et une altération du comportement, commencent à être discutés dans la littérature (Dubowitz, 2013 ; Ricotti *et al.*, 2013 ; Zatz et Pavanello, 2013) et restent la première cause d'abandon de ce traitement. De plus, l'impact des stéroïdes sur les processus cognitifs reste à préciser. En effet, les glucocorticoïdes endogènes régulent le métabolisme hippocampique (jouant un rôle majeur dans la mémoire et l'apprentissage) et semblent essentiels pour maintenir le fonctionnement cognitif dépendant du cortex préfrontal (notamment la mémoire de travail : Mizoguchi *et al.*, 2004).

De grands progrès ont été faits dans la compréhension des bases cellulaires et moléculaires de l'altération musculaire induite par l'absence de la dystrophine (Rahimov et Kunkel, 2013 pour une revue). A la lumière de ces découvertes, de nombreuses stratégies thérapeutiques sont développées dans des études précliniques sur des animaux modèles de cette pathologie, de la pharmacologie aux thérapies géniques et cellulaires, et quelques essais cliniques sont en cours (Wein *et al.*, 2015). En revanche, très peu d'études, hormis celles effectuées dans notre laboratoire, ont envisagé des traitements qui pourraient corriger à la fois les altérations musculaires et cérébrales dans ce syndrome. Certaines approches spécifiques de thérapie génique offrent un espoir réaliste dans ce sens (e.g., Goyenvalle *et al.*, 2015), mais la nature des atteintes cognitives et les mécanismes neurobiologiques sous-jacents sont encore mal compris, en partie du fait de l'étiologie complexe de ces troubles qui dépendent de plusieurs formes cérébrales de dystrophine.

2. Des atteintes centrales non évolutives

La dystrophine est largement exprimée dans le système nerveux, *incluant les organes sensoriels*, ce qui explique que le syndrome de DMD se caractérise également par une large collection d'altérations cérébrales (retard d'apprentissage de la lecture, altérations du langage, déficience intellectuelle, autisme), qui rend aujourd'hui nécessaire d'envisager des thérapies, non plus ciblant exclusivement le muscle, mais également le cerveau. A vrai dire, il devient même de plus en plus important de réparer ces atteintes cérébrales, comme

l'espérance de vie des patients augmente régulièrement : il y a trente ans, les thérapies visaient des enfants, encadré par leurs parents. Aujourd'hui, la population DMD est hétérogène et se compose tout autant d'enfants que d'adultes en partie autonomes, possédant un appartement et un emploi (Abbott *et al.*, 2012). Comprendre *-et surtout identifier avec précision-* la nature et l'origine de ces altérations centrales n'a pas qu'une visée thérapeutique pour améliorer la qualité de vie et la prise en charge des patients. En effet, depuis quelques années, ces marqueurs ont permis un dépistage toujours plus précoce de la maladie, avant même l'apparition des premiers signes musculaires.

a. Précocité des troubles

L'enfant atteint de dystrophie musculaire de Duchenne montre très peu de signes cliniques avant 3 ans, mais les diagnostics s'améliorent continuellement notamment par la détection précoce des troubles du développement cognitif et psychomoteur, caractéristiques de la maladie, à l'aide d'échelles spécifiques de mesure. Sans être identiques, ces différentes échelles tendent à mesurer des paramètres clefs du développement. L'annexe I (page 191) présente les sous-tests de l'échelle de Bayley, pour exemple. Elle s'intéresse à la cognition, au langage (expression et compréhension), à la fonction motrice (fine et globale), aux fonctions socio-affectives et au comportement général (questionnaires complétés par les parents). Une autre échelle utilisée est celle de Griffiths, dite échelle de développement, applicable de 0 à 8 ans et explorant six domaines (motricité, sociabilité-autonomie, langage, intégration occulo-manuelle, performances et raisonnement pratique). Les résultats sont exprimés en âge de développement et en quotient de développement. Les échelles de Wechsler⁴ regroupent plusieurs versions du test selon les tranches d'âge : Le WPPSI (Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence), destiné aux enfants d'âge préscolaire, le WISC (Wechsler Intelligent Scale for Children), étalonné pour des enfants jusqu'à 15 ans et le WAIS (Wechsler Adult Intelligence Scale) pour les grands adolescents et les adultes. Ces échelles vont donner trois scores : le Quotient Intellectuel complet, ou global (« Full Scale Intelligence Quotient », FSIQ, usuellement abrégé IQ ou QI en français), un quotient des capacités verbales (« Verbal Intelligence Quotient », VIQ) et un autre concernant les performances non verbales (« Performance Intelligence Quotient », ou PIQ, dépendant notamment des habiletés motrices⁵). Le FSIQ, le VIQ et le PIQ sont des scores composites basés sur divers tests. Le QI n'est pas fixe, son évaluation et sa notation sont régulièrement révisées et les scores ré-étalonnés en fonction de la population générale (voir annexe II, page 193, pour plus de détails).

Chieffo *et al.* (2015) ont mis en évidence, sur des patients âgés de quatre ans et moins, qu'ils avaient un score inférieur à la population saine, en moyenne d'un écart-type, en utilisant l'échelle de Griffiths et le WPPSI. La forte corrélation entre ces deux résultats

4. De nombreuses échelles d'évaluation du quotient intellectuel existent en 2016, mais par la suite, nous utiliserons le terme « QI » afin de faire référence au quotient intellectuel complet donné par l'une des échelles de Wechsler, étant l'échelle majoritairement utilisée au cours des dernières décennies.

5. Cette classification (VIQ, PIQ) s'applique de la première à la troisième révision des tests de Wechsler mais est à présent obsolète pour la quatrième révision de 2008. Par mesure de cohérence vis à vis de la bibliographie, les termes PIQ et VIQ seront conservés.

montre qu'avant même l'entrée à l'école, il est possible d'observer des altérations du fonctionnement cognitif chez les patients DMD. Cette étude vient aussi confirmer la présence d'une altération motrice, avant même la dégénérescence musculaire, appuyant le rôle de la dystrophine dans la coordination motrice, reposant sans doute sur le cervelet. Connolly *et al.* (2013), ont quant à eux réalisé leur étude sur des enfants dont l'âge est compris entre 1 mois et 36 mois. Ils utiliseront notamment l'échelle de Bayley, mais également d'autres échelles visant à quantifier l'émotivité et la mobilité générale de l'enfant. Ils retrouveront également des différences notables au niveau moteur, cognitif, ainsi qu'au niveau du langage et dans le développement social, comparativement à des enfants non myopathes. Ils rappellent que malgré la période d'amélioration motrice (durant les 6-7 premières années de vie, couramment appelée la « lune de miel »), on peut observer un retard dans cette acquisition par rapport à la population normale. En 2013, l'étude de Pane *et al.* vient renforcer cette hypothèse, montrant une altération cognitive déjà présente avant l'âge de 4 ans, et donc avant les premiers déficits moteurs chez les patients DMD. Mirski et Crawford (2014) ont effectué une méta-analyse sur 179 patients et ont trouvé une forte corrélation entre le retard de début de la marche (normalement vers 16 mois) et les retards cognitifs.

Les premières altérations cognitives sont donc présentes avant l'apparition des premiers symptômes musculaires et vont rester stables au cours de la vie, comme nous le verrons par la suite, en détaillant chaque aspect du phénotype cognitif des patients DMD.

b. Des altérations sensorielles à préciser

Un système sensoriel est une partie du système nerveux responsable de la sensation, regroupant les récepteurs sensoriels, les voies nerveuses et les parties du cerveau responsables du traitement de l'information sensorielle. On parle plus communément des cinq sens que sont la vision, l'odorat, le goût, l'ouïe et le toucher, mais notre perception s'avère beaucoup plus vaste, avec, par exemple, la nociception ou la thermoception.

Nos systèmes sensoriels vont nous permettre d'interagir avec notre environnement et d'adapter notre comportement. Par exemple, en pleine journée, la perception du soleil est traitée par deux voies sensorielles : la vue qui est sensible à la lumière, mais également par nos thermorécepteurs cutanés qui vont rendre compte de la température extérieure.

Lorsque ces mécanismes sont défectueux, c'est-à-dire qu'un individu a un défaut de détection, d'interprétation et/ou de réponse appropriée à un stimulus sensoriel, on parle d'altération des processus sensoriels (sensory processing disorder, ou SPD ; voir Koziol, *et al.* (2011) pour une revue). Un SPD suppose, bien évidemment, l'absence d'un handicap majeur des voies sensorielles, tel que peut l'être la surdité ou la cécité, mais englobe des maladies telles que la synesthésie, où au moins deux voies sensorielles forment des associations alors qu'elles ne sont normalement pas liées entre elles. La forme la plus commune reste l'hyper ou l'hyporéactivité en réponse à un stimulus auditif, visuel, tactile, oral ou olfactif. Les recherches sur le SPD sont de plus en plus nombreuses chez l'Homme, mais son diagnostic n'est toujours pas réalisé systématiquement, puisqu'il

n'apparaissait pas dans le DSM IV révisé⁶ de 2000 et n'a été que récemment intégrée au DSM V (sorti en mai 2013).

A l'heure actuelle, seules des altérations de la neurotransmission rétinienne ont été montrées chez les patients DMD (Cibis *et al.*, 1993 ; Fitzgerald *et al.*, 1994, 1999). Caractérisées par une diminution d'une onde spécifique de l'électrorétinogramme lors de l'adaptation à la vision nocturne (Cibis et Fitzgerald, 2001), et par un dysfonctionnement des cônes percevant le rouge et le vert (Barboni *et al.*, 2016), elles n'entraînent cependant pas d'altération majeure de la perception visuelle. Ricotti *et al.* (2015) démontrent que l'altération de l'ERG est plus grave quand la Dp71, une forme courte de dystrophine exprimée majoritairement dans le système nerveux central, est également mutée. En revanche, ceci suggère une perturbation de l'homéostasie ionique dans la rétine, peut-être en conséquence de l'altération du complexe associé à cette forme gliale de dystrophine impliquée dans l'ancrage des canaux potassiques et aqueux (Waite *et al.*, 2009).

De plus, des parents ont rapporté au Professeur Laura Case que leurs enfants présentent des caractéristiques de SPD. Certains enfants DMD sont hypersensibles à la stimulation tactile et se plaignent des coutures/plis de leurs chaussettes. D'autres vont être des mangeurs exigeants au regard des goûts, consistances ou textures des aliments. D'autres encore vont avoir du mal à contrôler leurs émotions ou supportent mal les environnements bruyants. Enfin, certains sont hyporéactifs et ne vont pas répondre lorsqu'on leur parle, ou vont chercher la stimulation en exerçant une activité excessive voire en sentant ou en mastiquant des objets (symptômes également présents dans le spectre autistique). Les résultats de ce groupe de travail ont été publiés par James Poysky (2007) qui rapporte également des cas de déficits attentionnels associés à une hyperactivité (attention deficit hyperactivity disorder, ADHD), ainsi que des troubles obsessionnels compulsifs (TOC).

c. Une déficience intellectuelle

En 2014, Vojinovic *et al.* ont mené une étude visant à quantifier l'impact des variants génétiques (nucléotidiques) du gène *dmd* sur la cognition d'une population saine. Ils concluent qu'il y a une relation entre ces variants mono-nucléotidiques et le fonctionnement cognitif, tout en précisant que d'autres études seront nécessaires pour réellement quantifier cet effet. C'est la première équipe à montrer que même au sein d'une population en bonne santé, des variations du gène de la dystrophine peuvent modifier les capacités cognitives.

Cependant, dès 1861, le Dr. Duchenne écrivait en parlant des patients, qu'ils avaient « *la parole tardive [et une] intelligence obtuse, quelquefois jusqu'à l'idiotie* ». De nos jours, on parle plus volontiers de déficience intellectuelle (voir annexe II, page 193, pour plus de détails). Dans leur méta-analyse (1 146 patients issus de 32 études réalisées entre 1960 et 1999), Cotton *et al.* (2001) estiment le QI moyen des patients à 80,2 (significativement différent de 100) avec un minimum à 14 et un maximum à 134. 34,8% ont un QI inférieur à 70, et 28% ont un QI inférieur à 50. Il tranchera également sur un vieux débat : *les patients ont-ils un QI verbal plus faible que le QI performance ?* Cotton apportera cette réponse : le

6. Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux, ouvrage de référence publié par la Société Américaine de psychiatrie qui classifie et catégorise les critères de diagnostiques de troubles mentaux.

QI verbal est effectivement 5 points plus faible que le QI performance, mais au vu de sa meta-analyse, cette différence n'est pas cliniquement significative. Il rappellera la difficulté de comparer ces deux éléments au vu de la possible existence de sous-groupes (en fonction des mutations) pouvant expliquer l'hétérogénéité des scores, qui n'a pas été prise en compte.

De nombreuses études démontrent que les scores au VIQ (mais également au PIQ et au FSIQ) restent stables au cours de la vie (Leibowitz et Dubowitz, 1981; Dorman *et al.*, 1988; Chieffo *et al.*, 2015), voire s'améliorent (Prosser *et al.*, 1969; Miller, *et al.*, 1985). Ceci sera confirmé par Cotton *et al.* (2005) qui ont réalisé une méta-analyse de toutes les études utilisant des scores aux PIQ, VIQ et FSIQ chez les patients DMD, et qui démontrent que ces scores restent stables (pour le PIQ et FSIQ) voire s'améliorent (pour le VIQ) au cours de la vie des patients, donc indépendamment de l'évolution de la dégénérescence musculaire. Plus récemment, Wingeier, *et al.* (2011) notent qu'il n'y a pas de déclin des fonctions cognitives avec l'âge, en utilisant une large batterie de tests cognitifs, ne se limitant pas à l'étude du quotient intellectuel.

La myopathie de Duchenne, et par extension toutes les maladies handicapantes, posent toujours une question à laquelle il est difficile de répondre : *L'atteinte musculaire entraîne-t-elle des altérations cognitives ou ces altérations sont-elles indépendantes du handicap moteur ?* Dans des études comparant des enfants DMD (la majorité, en fauteuil roulant) à des enfants atteints d'amyotrophie spinale (SMA ; Billard *et al.*, 1992) dont le phénotype moteur est encore plus prononcé, ou d'arthrite rhumatoïde juvénile (ARJ, Mento *et al.*, 2011), les auteurs montrent que les patients DMD ont des difficultés cognitives, contrairement aux patients SMA ou ARJ, démontrant que l'atteinte cognitive ne dépend pas de l'atteinte musculaire mais est un phénotype indépendant.

d. Des difficultés académiques liées aux processus cognitifs et exécutifs

Des études se sont intéressées aux capacités académiques des enfants DMD et ont notamment mis en évidence un retard d'acquisition de la lecture (Billard *et al.*, 1998), ou encore la présence de dyslexie (Billard *et al.* 1998 ; Astrea *et al.*, 2015). L'équipe de Lorusso *et al.* (2013) vont apporter des éléments précisant ces difficultés. Comme souvent, ils retrouvent une diminution du VIQ, du PIQ et du FSIQ, corrélée avec les difficultés de lecture qui se situeraient plus dans la vitesse que dans la précision. L'expression verbale est dans la norme, mais ils noteront une difficulté plus grande en ce qui concerne la compréhension syntaxique et grammaticale.

Cependant, chez les patients DMD, c'est principalement la mémoire de travail –*évaluée dans un des sous-tests du WISC*– qui a été étudiée. Le déficit concerne tous les patients, quel que soit leur profil de mutation et indépendamment de la présence d'une déficience intellectuelle. Cette forme de mémoire, qui a pour fonction le stockage temporaire d'informations et leur traitement, semble limitée à 7 ± 2 éléments, ce que l'on nomme l'empan mnésique (mis en évidence par Ebbinghaus dès 1885 dans son livre *Über das Gedächtnis* - littéralement « à propos de la mémoire »- traduit en anglais sous le titre

"*Memory: A Contribution to Experimental Psychology*"). Cowan (2001) précisera ce nombre, arguant qu'en réalité, l'empan mnésique est de 4 ± 1 items. La difficulté d'évaluation de cette mémoire repose sur sa place dans le circuit général de la mémoire : elle est au carrefour entre mémoire sensorielle et mémoire à long terme (Atkinson et Shiffrin, 1971), recevant et traitant les entrées sensorielles pour les maintenir temporairement via l'autorépétition.

On ignore le fonctionnement exact de cette mémoire de travail, mais de nombreux modèles existent, le plus reconnu étant celui de Baddeley (1998, 2010) :

Baddeley propose un modèle composé de trois sous-systèmes. Tout d'abord, la boucle phonologique qui est capable de retenir et manipuler les informations sous forme verbale, tandis que le calepin visuo-spatial est chargé des informations codées sous forme visuelle. Ces deux sous-systèmes sont coordonnés par un administrateur central qui assure un mécanisme attentionnel de contrôle, permettant l'intégration des informations et leur mise en relation avec les connaissances conservées en mémoire à long terme. Il ajoutera par la suite un quatrième sous-système, le tampon épisodique, qui permet le regroupement des informations (issues de la boucle phonologique, du calepin visuo-spatial et de la mémoire à long terme) avant leur intégration (Repovš et Baddeley, 2006).

Baddeley suppose plusieurs prérequis : Premièrement, la mémoire de travail serait dépendante du vocabulaire (boucle phonologique) et donc des connaissances à long terme du sujet. Il serait donc possible de moduler et d'augmenter sa capacité en enrichissant son vocabulaire ou en effectuant des regroupements. Ensuite, le fonctionnement du calepin visuospatial suppose, quant à lui, une absence de déficit sensoriel visuel et, enfin, il ne doit pas exister d'altération des voies reliant la mémoire à long terme avec ces informations à court terme.

Selon Baddeley, la mémoire de travail reposerait sur l'activation des cortex (pré)frontal, postérieur gauche, et inféro-temporal droit (pariétal et occipital). Actuellement, on inclut aussi le cervelet, le noyau latéral pontin et le thalamus (Desmond *et al.*, 1997 ; Friedman et Miyake, 2016 pour une revue détaillée).

L'équipe de V. Hinton a publié plusieurs études concernant la mémoire de travail verbale chez les patients DMD. Ces études sont importantes car elles ont contribué à une fracture entre les résultats cliniques et les résultats issus des modèles animaux de myopathies. En 2000, son équipe va démontrer deux résultats essentiels : tous les patients atteints de DMD présentent des déficits de mémoire de travail verbale, en comparaison avec leurs frères et sœurs non affectés, et ce déficit est indépendant de la mutation. Ils expliquent que les patients n'ont pas de difficulté lorsqu'il s'agit uniquement de retenir l'information, mais présentent des déficits à partir du moment où un travail cognitif est à effectuer sur les informations. Ils conclurent que les patients ont des problèmes d'attention et de mémorisation immédiate, spécifiquement au niveau de la boucle phonologique proposée dans le modèle de Baddeley (Hinton *et al.*, 2000). Les bases d'un déficit de mémoire à court terme chez les patients, spécifiquement de la mémoire de travail, furent posées lorsque Hinton *et al.* expliquèrent que les déficits apparaissent quand la charge auditive augmente dans le Token Test. Trois ans plus tard, étudiant l'évolution académique des patients, ils nuanceront leurs résultats précédents, trouvant des altérations indépendantes

de la mémoire de travail. Leur étude conclut en insistant sur le fait que les problèmes majeurs sont liés à l'empan mnésique et à l'attention, plutôt qu'à la capacité de manipuler mentalement les informations (Hinton *et al.*, 2004). L'équipe de Wicksell *et al.* (2004) a également démontré des déficits de mémoire à court terme, plutôt qu'à long terme, mais ils rappelleront les grandes problématiques qui se posent lors de l'étude des fonctions cognitives chez les patients DMD : Il est important de prendre en compte le type de mutation (et donc le nombre de dystrophines absentes), ainsi que le profil émotionnel, qui font varier les performances à ces tests.

Il faudra attendre encore trois ans pour qu'on démontre la présence de déficits de mémorisation verbale, attribués à un empan mnésique réduit, mais ayant des répercussions à long terme (Hinton *et al.*, 2007). L'année suivante, Cyrulnik et Hinton (2008) situeront la base neurobiologique de ces déficits au niveau du cervelet, s'appuyant sur des modèles issus d'études de la neuroimagerie. Ils rappelleront alors que ces résultats vont dans le même sens que ceux observés chez les modèles murins, ouvrant un débat de réconciliation entre les cliniciens arguant des déficits de mémoire à court terme et les chercheurs qui ne trouvaient que des déficits de mémoire à long terme dans les modèles murins. L'étude de Lorusso *et al.* (2013) relève d'ailleurs également des problèmes de mémoire à long terme, plutôt qu'à court-terme / de travail, chez les patients, et met en évidence une corrélation entre le retard d'apprentissage de la lecture et le QI, mais pas avec les performances de mémoire de travail, suggérant une implication des processus de consolidation mnésique dépendant de l'hippocampe.

e. Une plus forte incidence des troubles émotionnels

Le concept d'émotion est débattu depuis des millénaires, les philosophes étant parmi les premiers à mener une analyse afin de décoder cette partie du comportement humain. Platon définira, quatre siècles avant notre ère, une structure tripartite de l'âme posant les bases d'une scission qui va perdurer entre émotion, motivation et cognition. Le Littré, dictionnaire paru à la fin du XIXème siècle, définit les émotions comme « *un mouvement moral qui trouble et qui agite* », considérant les émotions comme néfastes pour l'humain. Descartes perpétuera cette idée de dualisme, considérant les émotions comme une cognition confuse sans valeur.

A l'inverse, à l'autre bout du monde, vécut cinq siècle avant Jésus-Christ un dénommé Siddhārtha Gautama, au Népal. Il définit « 51 formations mentales », tantôt bénéfiques (l'équanimité, l'humilité, la vigilance), tantôt néfastes (la colère, l'agitation, la distraction). Son approche, à l'opposé de nos philosophies occidentales, est aujourd'hui utilisée dans de nombreuses thérapies comportementales des troubles émotionnels, telle que la méthode de réduction du stress (MBSR) portée par le Dr. John Kabat-Zinn en Amérique et le psychiatre Christophe André en France.

A l'heure actuelle, aucun consensus tant sur les modèles théoriques que sur la définition des émotions n'existe. C'est la première difficulté pour un chercheur désireux d'étudier cette modalité, Kleinginna et Kleinginna (1981) ont ainsi répertorié dans la littérature plus de 92 définitions différentes de l'émotion sur une période de 10 ans.

Cependant, depuis environ un siècle, les neurosciences ont postulé un modèle dit des théories cognitives. Une théorie particulièrement intéressante dans le cadre de ce travail est celle de Lazarus (Lazarus, 1991), pour qui la cognition est une condition nécessaire et suffisante aux émotions. Il développe une théorie relationnelle basée sur les concepts de l'évaluation cognitive (*appraisal*). Selon lui, les émotions seraient la résultante d'une interaction permanente entre le sujet et son environnement, la nature humaine voulant toujours tendre vers le bien-être personnel. Il insiste sur deux processus d'évaluation : Premièrement, l'évaluation de la pertinence d'un stimulus/événement par rapport à son bien-être. Ensuite, notre capacité à faire face à un événement affectant nos buts (*coping*). Ces évaluations sont flexibles, offrant des possibilités de révisions correctives en cours de route (*reappraisal*).

Il est très important de prendre le temps de comprendre toute la difficulté de l'émotion. Elle va en effet être à la base de nos aptitudes à mémoriser les informations, mémoire qui, par la suite, permettra à un individu de se construire, et établira sa capacité d'apprentissage (Bower *et al.* 1981).

Plusieurs auteurs ont tenté d'expliquer les déficits intellectuels observés chez les patients DMD par les aspects émotifs liés à cette maladie handicapante. Sollee *et al.* (1985) rapportent que les enfants DMD obtiennent de meilleurs scores à différentes épreuves neuropsychologiques à partir du moment où ils deviennent dépendants du fauteuil roulant électrique. Les parents ont observé que leurs enfants se montrent plus détendus et plus conscients de leur environnement, pouvant maintenant se déplacer d'un endroit à l'autre avec plus de facilité et moins de perte d'énergie. Dague et Temboury (1974) relèvent aussi une curiosité intellectuelle plus vive chez ceux se déplaçant en fauteuil. Les résultats des recherches de Leibowitz et Dubowitz (1981) vont dans le même sens lorsqu'ils rapportent plus de problèmes de comportement selon l'échelle de Rutter chez les jeunes patients que chez les plus âgés. Devant les difficultés d'abstraction et de pensée symbolique observées au WISC chez les enfants DMD, Benony (1986) donne une interprétation psychanalytique. Ces difficultés d'apprentissage révéleraient d'une incapacité à retenir l'information, les enfants restant figés par l'angoisse qui envahirait l'ensemble du fonctionnement cognitif. Cette interprétation est cependant soumise au doute, comme démontré dans l'étude de Fee et Hinton (2011), utilisant la *Child Behavior Checklist* (CBCL), qui est un test normalisé pour évaluer le comportement général de l'enfant. Dans cette étude, 84% des enfants DMD, bien qu'ils vivent avec cette maladie handicapante –*et à terme fatale*– ne sont pas considérés comme « à risque » pour les aspects psychosociaux. Les auteurs démontrent l'importance du soutien social, défini comme le nombre et la qualité des interactions, dans le processus de résilience⁷, et montrent que le niveau intellectuel de l'enfant est indépendant de son profil psychosocial. Ceci supporte le modèle de Lazarus, dans lequel les facteurs environnementaux vont essentiellement modifier la réponse émotionnelle de l'enfant. Fee et Hinton concluent en disant que si la résilience est une « adaptation positive à l'adversité », alors la nature quantifiable de l'adversité est moins importante pour l'enfant que son adaptation positive à l'adversité (résilience) exprimée. Pehler et Craft-Rosenberg

7. La résilience est définie comme « un processus dynamique englobant une adaptation positive au sein d'un contexte d'adversité majeur ».

(2009) ont mené une étude sur le rapport des enfants myopathes vis-à-vis du *désir* de ce qu'ils ne peuvent pas faire au quotidien. Il est intéressant de constater que la majorité ne vit pas cette impossibilité comme un manque, mais comme une partie de leur expérience de vie. Les auteurs ont choisi la relation des enfants à la religion, ou à la spiritualité comme point central de leur étude, mais ils finissent par exprimer la même conclusion que dans l'étude de Fee et Hinton (2011) : La connexion, qu'elle soit au travers des relations sociales, avec son soi intérieur, ou avec un Dieu, aide l'enfant à surmonter sa maladie et lui permet d'appréhender son quotidien de façon plus heureuse. Dans une étude plus récente, Pangalila *et al.* (2015) s'intéressent à la prévalence de la douleur, de la fatigue et de la dépression chez des enfants DMD. La majorité des patients note sa qualité de vie comme étant « bonne » ou « très bonne », même si tous avouent vivre de façon permanente avec la douleur et une fatigue certaine, et les symptômes de dépression sévère sont aussi fréquents que dans la population saine. Cependant, ils notent que les symptômes de dépression légère et modérée sont deux fois plus fréquents. Fitzpatrick *et al.* (1986) en revanche, trouveront un syndrome dépressif majeur chez leurs patients DMD. Ce que viendra confirmer Roccella *et al.* en 2003 qui trouvent des preuves d'isolement, de basse estime de soi, de marginalisation, de symptômes mineurs de dépression, de signes d'insécurité, d'hypochondrie et d'anxiété chez les DMD. Lu *et al.* (2016) trouvent de nombreuses altérations (capacités physiques, relations sociales) chez les patients DMD, mais mettent surtout en avant le rôle essentiel de l'environnement pour que les patients deviennent résilients. Les problèmes émotionnels sont également soulevés dans la récente étude de Ricotti *et al.* (2016), en particulier au niveau du comportement d'agression, de l'hyperactivité, de la conciliation et de l'anxiété. Cependant, même si Ricotti *et al.* notent une prévalence accrue d'anxiété, ce n'est pas le cas de Pangalila *et al.* (2015). La question n'est donc pas facile à trancher, même si la part environnementale (*soutien*) semble jouer un rôle crucial. C'est d'ailleurs l'objet de l'étude de Yamaguchi et Suzuki (2015) qui s'intéresse en particulier au rôle des parents dans ce soutien quotidien et à l'importance que revêt l'accompagnement des parents, qui sont eux aussi à risque, au vu de la difficulté de soutenir un enfant atteint d'une maladie fatale. Ils apportent des éléments intéressants concernant l'évolution du soutien parental lorsque les enfants DMD deviennent adolescents et adultes grâce au progrès médical.

Le profil émotionnel des patients DMD est certes loin d'être similaire à celui de la population saine, cependant les cliniciens mettent réellement en avant l'importance du soutien psychosocial dans l'accompagnement quotidien, et la capacité que présente les malades à juger leur qualité de vie comme étant « bonne » à « très bonne », appuyant l'importance des facteurs environnementaux et du travail cognitif permettant d'être résilient face à cette situation pathologique.

L'importance de ce soutien, essentiel pour la qualité de vie des patients, biaise cependant les études. Il est impossible pour un clinicien de savoir si les troubles émotionnels sont spécifiques, c'est à dire liés à la perte de la dystrophine dans le cerveau, ou purement sociétaux, donc dépendants des facteurs familiaux, environnementaux ou liés au handicap.

f. Des troubles neuropsychiatriques

De nombreuses études suggèrent que le profil neurocomportemental des enfants DMD inclut des altérations du comportement social. L'équipe de Komoto (1984) est la première à décrire le cas d'un enfant DMD qui sera diagnostiqué autiste par la suite. Une étude plus récente et complète, celle de Wu *et al.* (2005) note, sur 158 patients, une comorbidité plus élevée entre DMD et autisme (3.8%) que dans une population saine. Hendriksen et Vles (2008) viendront appuyer cette affirmation, trouvant une comorbidité de 3.1% dans une cohorte de 351 patients. On retrouvera également quelques pistes du lien entre autisme et dystrophie dans les études de Hinton *et al.* (2007) qui montrent que les patients ont un léger déficit dans la reconnaissance des expressions faciales, suggérant des perturbations en relation avec la théorie de l'esprit. Cette étude fait suite à celle de 2006 où ils montraient que 20% des patients excèdent le score requis pour le diagnostic de l'autisme, basé sur l'Autisme Diagnostic Interview (ADI, version révisée en 1994 par Lord *et al.*, qui est un questionnaire d'environ 2h30 à destination des parents). Banihani *et al.* (2015) ont utilisé l'ADOS (Autism Diagnostic Observation Schedule), qui dure environ 2h30, et les critères du DSM, pour diagnostiquer les troubles du spectre de l'autisme. Ils trouvent une incidence de 15%, précisant que majoritairement, l'autisme n'est pas associé à une déficience intellectuelle. Un point litigieux reste cependant présent : le diagnostic de l'autisme se réalise usuellement à minima en combinant les résultats de l'ADI et de l'ADOS, ce qu'aucune étude n'a réalisé. Un autre moyen de diagnostiquer l'autisme est d'utiliser le 3Di (Developmental, Dimensional and Diagnostic Interview), d'une durée d'environ 45min, ce qu'ont réalisé Ricotti *et al.* (2016) qui trouvent une incidence de 21%. Ils relèvent également le manque de données utilisant de concert l'ADI et l'ADOS et préviennent de la surestimation possible de l'incidence de l'autisme avec le 3Di. En France, dans les CRA (Centre Ressource Autisme), l'autisme est diagnostiqué par une équipe multidisciplinaire dont les entretiens s'échelonnent sur un minimum de 3 demi-journées comprenant l'ADI, l'ADOS, un test de QI (comme le WPPSI ou le WISC) et une multitude d'autres tests psychomoteurs. Cependant, bien qu'incomplètes, les données de Hinton, Banihani et Ricotti ne laissent d'ores et déjà aucun doute quant à l'association entre l'altération de la dystrophine et l'autisme.

La dystrophine étant en interaction avec des protéines impliquées dans les désordres du spectre autistique, comme les neuroligines (Reissner *et al.*, 2013), les neurexines, les récepteurs du GABA et du glutamate, la protéine adaptatrice PSD95 (par exemple, voir Chen *et al.*, 2014 ; pour une revue), cela renforce l'hypothèse d'un lien entre l'absence ou l'altération (dans le cas de la myopathie de Becker, voir Young *et al.*, 2008) de la dystrophine et le syndrome autistique. Ces données moléculaires suggèrent une altération des mécanismes neurobiologiques et notamment synaptiques, qui sont généralement associés aux désordres du spectre autistique et à leur comorbidité avec la déficience intellectuelle (Belmonte et Bourgeron, 2006). L'hypothèse d'un lien avec une altération des réponses émotionnelles et/ou des fonctions exécutives a aussi été soulevée dans une récente publication de notre équipe (Miranda *et al.*, 2015), ce qui semble cohérent avec les modèles neurocognitifs associés à l'autisme (Hill, 2004 ; 2004 ; Lartseva *et al.*, 2014 ; Craig *et al.*, 2016). Les modèles animaux, pour lesquels les facteurs génétiques et environnementaux peuvent être relativement bien plus contrôlés, pourraient donc apporter

des éléments de réponse plus objectifs sur le rôle des dystrophines dans ces manifestations cliniques.

L'autisme n'est pas le seul trouble neuropsychiatrique dont la comorbidité avec la DMD est plus élevée. Hendriksen et Vles (2008) notent une augmentation des troubles déficitaires de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDA/H, 11.7%) ainsi que des troubles obsessionnels compulsifs (TOC, 4.8%) en précisant que le traitement aux corticostéroïde ne serait pas impliqué, contrairement aux déficits de mémoire de travail qui pourraient être en partie influencés par le traitement. Ceci est confirmé par les études de Ricotti *et al.* (2016) qui trouvent une incidence d'TDA/H de 32% et de Banihani *et al.* (2015), qui trouvent la même incidence d'ADHD et de TOC (5%). Ricotti *et al.* (2016) et qui concluent une partie de leur étude en avançant que la comorbidité entre autisme, TDA/H et DMD a été sous-diagnostiquée jusqu'à présent, ce qui est un gros problème.

3. Une variabilité phénotypique liée à la complexité du gène *dmd*

a. Plusieurs promoteurs, plusieurs formes de dystrophines

L'histoire de la myopathie du Duchenne a pris une nouvelle tournure en 1988 lorsque Koenig *et al.* ont publié la séquence complète du gène *dmd*, qui contient 2,4 mégabases d'ADN, soit environ 1% du chromosome X. La partie codante (environ 14 kilobases) contient 79 exons séparés par des introns pouvant atteindre 200 kb et seulement 0,6% du gène code pour la dystrophine. A cette époque, comme l'ont souligné Perronnet et Vaillend (2010) « *nous étions bien loin de soupçonner un rôle pour la dystrophine dans une variété de tissus incluant le système nerveux central*⁸ ».

A l'heure actuelle, nous connaissons parfaitement la structure des séquences codantes du gène *dmd* (Figure 3 – Différents produits du gène *dmd*, **ci-dessous**). La présence de plusieurs promoteurs internes au gène -*entraînant l'expression de dystrophines de longueur variable*- dévoile qu'à présent, nous devons parler *des dystrophines* et non plus de *la dystrophine*. Ces différentes formes sont probablement à la base de la variabilité des altérations cognitives observées chez les patients. Leur profil d'expression allant du muscle au système nerveux central pose de nouvelles questions (voir le chapitre II : Les dystrophines et leurs partenaires, page 42).

8. En anglais dans le texte original : « ...we were far from expecting a role for this protein in a variety of tissues including the central nervous system (CNS) ».

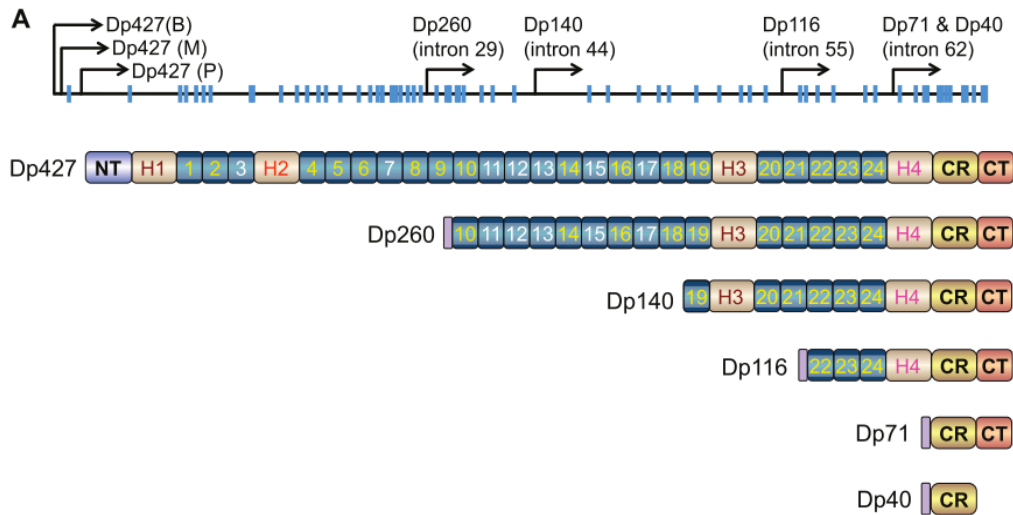


Figure 3 – Différents produits du gène *dmd*

Le trait noir représente autant le gène *dmd* que ses introns, tandis que les barres bleues verticales correspondent à la partie codante (exons). Les flèches représentent les promoteurs internes. Trois génèrent la forme longue, dite « complète » de la dystrophine (Dp427, pour dystrophin protein of 427 kDa) et vont entraîner son expression dans différents tissus (B : brain, M : muscle, P : cellules de Purkinje), les quatre autres vont permettre l'expression de dystrophines plus courtes : Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 et Dp40. La dystrophine se compose de 4 domaines : amino-terminal (NT), central, riche en cystéine (CR) et terminal (CT). Le domaine central comprend 24 triples hélices de type spectrine (boîtes contenant les nombres, en blanc celles chargées positivement, en jaune, négativement) et de quatre domaines charnières riches en résidus proline (H1 à H4). Excepté pour la Dp140, chaque dystrophine possède un unique N-terminal non présent dans la forme complète (McGreevy, *et al.*, 2015).

Vue la structure du gène, une mutation perturbant le cadre de lecture (codon STOP, délétion) mais située avant l'intron 29 entrainera la perte de la forme longue de la dystrophine, mais pas celle des autres formes, plus courtes, puisque leur transcription est initiée au niveau de promoteurs qui sont en aval de cet intron. Au contraire, les mutations localisées en aval de l'intron 62 peuvent affecter l'ensemble des dystrophines. L'absence de la Dp427 est le point commun à tous les patients DMD. La Dp427 est la forme exprimée dans le muscle squelettique et sa perte est responsable de la myopathie de Becker, forme moins sévère de myopathie, repose sur la perte partielle de la Dp427 ou l'expression d'une forme tronquée de la protéine.

Les deux tableaux présents en annexe III (page 195) reviennent en détail sur les domaines fonctionnels de la dystrophine et sur les différents produits du gène *dmd*.

b. Impact de la perte des dystrophines sur les capacités intellectuelles

Dès les années 90, les études comportementales en laboratoire sur des modèles animaux de la myopathie de Duchenne se basent sur une connaissance précise de la ou des dystrophines mutées. En revanche, les études cliniques ont fréquemment été effectuées sur des cohortes de patients susceptibles de présenter des génotypes très variables et les relations génotype-phénotype ne sont pas encore clairement étudiées. Historiquement, c'est l'association entre le quotient intellectuel et le génotype qui a été étudié. Lindlöf *et al.*

(1989) sont les premiers à remarquer que la fréquence de déficience intellectuelle semble augmentée lorsque la mutation est présente dans la deuxième partie du gène de la dystrophine. Mais la résolution de leur technique -à base d'enzyme de restriction HindIII- ne leur permet pas d'être plus précis. D'autres études (Covone *et al.*, 1991 ; Hodgson *et al.*, 1992 ; Nicholson *et al.*, 1993 ; Bresolin *et al.*, 1994 ; Bushby *et al.*, 1995) conduiront à la même conclusion, bien que tous les auteurs restent prudents, concluant qu'il peut y avoir, ou non, déficience intellectuelle, lorsque la seconde partie du gène est délétée. Au vu des connaissances actuelles, ce qu'ils appellent « deuxième partie du gène » (les huit derniers kilobases de l'ARNm de la Dp427) pourraient correspondre à la perte d'expression de la Dp140, Dp116 et Dp71 (voir Annexe 3 : Du gène à la protéine, page 195). C'est en 1991 que deux études viennent apporter des éléments importants au débat. Den Dunnen *et al.* (1991) mettent en évidence que la forme longue de la dystrophine est compatible avec une cognition normale (confirmé par Rapaport *et al.* en 1992) tandis que Rapaport *et al.* (1991) relèvent une apparente association entre la déficience intellectuelle et la délétion de l'exon 52. Dans les années suivantes, Roberts *et al.* (1992), Lenk *et al.* (1993) et Tuffery *et al.* (1995) vont identifier des mutations ponctuelles touchant la partie distale du gène de la dystrophine des patients DMD atteint de déficience intellectuelle. Ces études pionnières suggèrent que cette séquence du gène serait impliquée dans la genèse de la déficience intellectuelle. A cette époque, la forme courte de la dystrophine n'a été découverte que trois ans auparavant, mais Rapaport pose déjà l'hypothèse, dans son étude de 1991, que c'est une dystrophine courte (Dp140 ou Dp71) qui pourrait être à la base des altérations intellectuelles. Cette hypothèse est d'autant plus crédible que la Dp71 possède un promoteur entre les exons 62 et 63 tandis que la Dp140 possède son site d'initiation dans l'exon 51. En 1998, Moizard *et al.* (1998) relèvent le manque d'études ayant collectées à la fois des données moléculaires -profil individuel de mutation- et des données neuropsychologiques sur les patients DMD et publient un article visant à répondre à une question non résolue durant cette décennie : *la Dp71 et la Dp140 sont-elles impliquées dans la déficience cognitive observée chez les patients DMD ?* Retrouvant à la fois la baisse généralisée du QI chez les patients myopathes (Emery *et al.*, 2015, mais initialement décrite dans l'édition de 1992) et une altération marquée dans les tâches verbales (Billard *et al.*, 1992 ; Bresolin *et al.*, 1994), ils montrent qu'il n'y a pas de relation simple entre les altérations cognitives et la localisation de la mutation dans le gène *dmd*. Malgré cette absence de simplicité, leur conclusion est claire : les mutations dans la partie distale du gène tendent à être plus souvent associées avec une déficience intellectuelle que celles dans la partie proximale. Ils établissent trois grandes hypothèses : (1) L'absence de la forme longue de la dystrophine affecte variablement la cognition (den Dunnen *et al.*, 1991 ; Rapaport *et al.*, 1992), (2) Les mutations affectant la forme longue et la Dp140 sont associées à des altérations cognitives et (3) Les mutations affectant toutes les dystrophines -incluant la Dp71- sont associées à des retards mentaux sévères. Ils vérifient cette dernière hypothèse deux ans plus tard (Moizard *et al.*, 2000). La même année deux études viendront confirmer le rôle de la Dp140 dans le fonctionnement cognitif des patients DMD (Bardoni *et al.*, 2000 ; Felisari *et al.*, 2000), mais également chez les patients atteints de myopathie de Becker, dont le profil cognitif est tout autant altéré par la perte de la

Dp140 (Bardoni, *et al.*, 1999). Les années 1990 furent une décennie cruciale dans l'étude du lien entre mutations et déficience intellectuelle.

Au cours des années suivantes, moins d'études vont s'y intéresser, ou alors uniquement pour confirmer ce qui a été précédemment observé (Giliberto *et al.*, 2004). Cette décennie calme ne signifie pas pour autant l'absence de travaux sur le sujet. Les progrès, à la fois en biologie moléculaire et dans les diagnostics cliniques, vont permettre l'émergence d'une nouvelle littérature, précisant d'autant plus ces relations génotype-phénotype.

Après un suivi de plus de dix ans (entre 1990 et 2000) par la même équipe médicale collectant systématiquement des données deux fois par an, Desguerre *et al.* ont publié, en 2009, une étude très riche sur l'hétérogénéité clinique des patients DMD, définissant précisément quatre sous-phénotypes permettant d'établir des critères prédictifs de l'évolution de la maladie. Le phénotype moteur (classifié de « médiocre » à « très médiocre ») est indépendant de la localisation de la mutation (tous les patients DMD ayant perdu la Dp427), contrairement au phénotype cognitif (classifié « normal » à « très médiocre ») qui est corrélé avec la nature des dystrophines mutées. Il est en revanche impossible d'établir une relation simple entre le génotype et le phénotype cognitif, comme le notait déjà Moizard *et al.* dix ans plus tôt. En effet, lorsque toutes les dystrophines sont mutées (mutation après l'exon 63), la présence de déficience intellectuelle est certaine, mais en revanche, dans le groupe ayant perdu uniquement la forme complète, le fonctionnement cognitif varie de normal à médiocre. Les auteurs ne donnent aucune explication à cette variabilité, cependant nous aborderons dans le II (à partir de la page 42), la richesse des profils d'expressions, épissages post-transcriptionnels et interactions avec d'autres protéines des dystrophines, qui pourraient probablement expliquer que la variabilité du fond génétique des individus puissent donner lieu à cette hétérogénéité phénotypique. En Juillet de la même année, Daoud *et al.* se focalisent sur le rôle de la Dp71 dans la sévérité de ce retard mental. Ils trouvent que tous les patients ayant une mutation affectant la Dp71 présente une déficience intellectuelle, alors que ceux dont toutes les dystrophines sont mutées, à l'exception de la Dp71, présentent une cognition plus variable, à l'image de l'étude de Desguerre *et al.* (2009). De plus, ils ne se focalisent pas uniquement sur la myopathie de Duchenne, mais également sur la myopathie de Becker où les patients possédant une mutation affectant la Dp71, présentent également une déficience intellectuelle. Ils concluent leur étude en suggérant que les mutations touchant la Dp427 n'entraîne pas toujours une altération cognitive et que la perte de la Dp140, serait un facteur de susceptibilité de déficience intellectuelle.

L'année suivante, Taylor *et al.* (2010) publient une étude encore plus détaillée, reliant le quotient intellectuel complet (FSIQ) aux formes de dystrophines mutées, venant confirmer encore plus l'existence de ce lien génotype-phénotype. Pour les patients avec des mutations avant l'exon 30 (perte de la Dp427 seulement), le FSIQ moyen est de 93, pour les patients ayant des mutations entre les exons 46 à 79 (perte de la Dp140 et/ou Dp71), le FSIQ moyen est de 74.

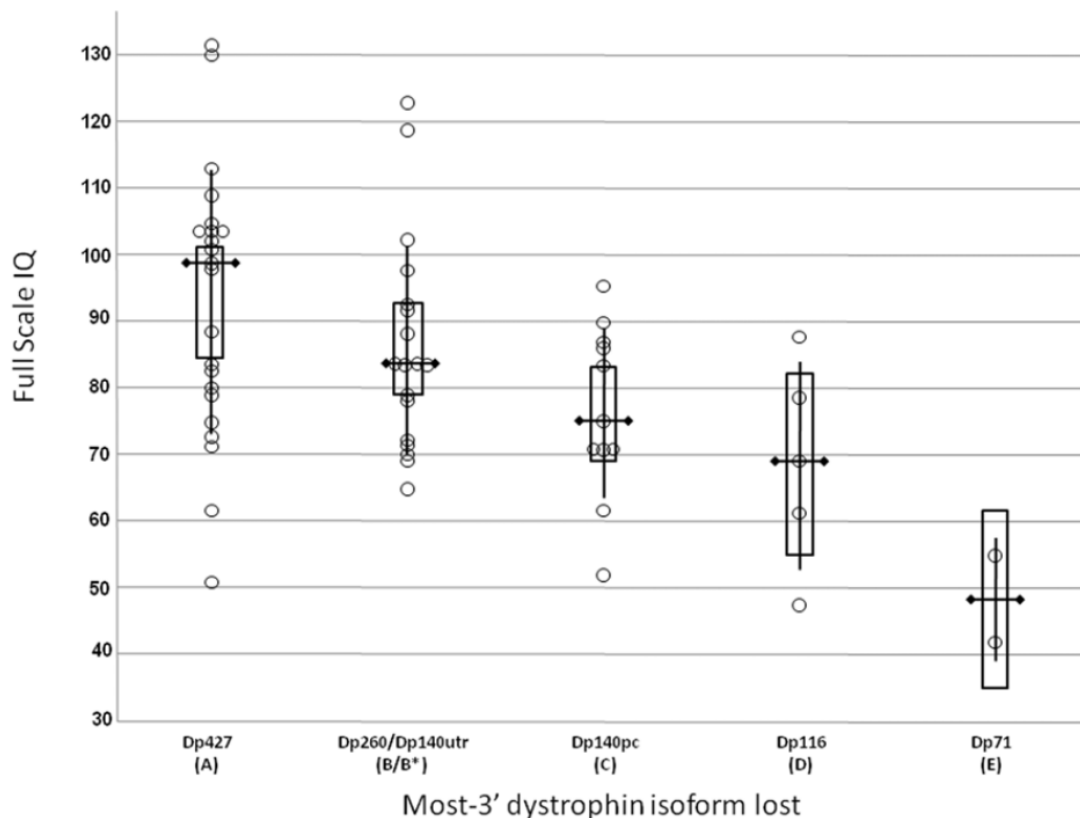


Figure 4 - Effet de la perte cumulative des dystrophines sur le FSIQ

Représentation de la valeur du FSIQ (en ordonnée) par rapport aux dystrophines affectées (en abscisse). La perte étant cumulative, le premier groupe est déficient uniquement en Dp427, le troisième en Dp427, Dp260 et Dp140 et ainsi de suite. Les auteurs ont également regardé l'impact de la perte du 5' UTR (une séquence régulatrice) de la Dp140 (Dp140utr, second groupe). Cercle : valeur individuelle par patient, ligne verticale : ± 1 déviation standard à la moyenne, boîte : intervalle de confiance à 95%, barre horizontale : médiane (Taylor *et al.*, 2010).

Wingeier *et al.* (2011) confirment les altérations cognitives associées à la perte de la Dp140, ce qui sera confirmé par Rasic *et al.* (2014) dans une étude similaire mais plus précise sur le rôle de la région 5' UTR de la Dp140 (Dp140utr). Cette séquence est intéressante car très longue (elle s'étend des exons 45 à 50), mais il est très difficile de savoir si elle va ou non impacter l'expression de la Dp140. Une façon de faire est donc de comparer le FSIQ des patients qui ont perdu cette région régulatrice par rapport à ceux présentant des mutations au sein de la séquence codante pour la Dp140 (Dp140pc). Là où Taylor *et al.* (2010) ne trouvent qu'une faible participation de la perte de la région 5' UTR de la Dp140, Rasic *et al.* (2014) vont trouver un FSIQ significativement plus faible lorsque la mutation se trouve au sein de la séquence codante pour la Dp140 (FSIQ : Dp140utr : 93,86 vs Dp140pc : 78,33), ainsi que Chamova *et al.* (2013) (FSIQ : Dp140utr : 90,31 vs Dp140pc : 78,88).

Banihani *et al.*, 2015 ont réalisé une étude très détaillée du FSIQ en fonction des mutations des patients DMD.

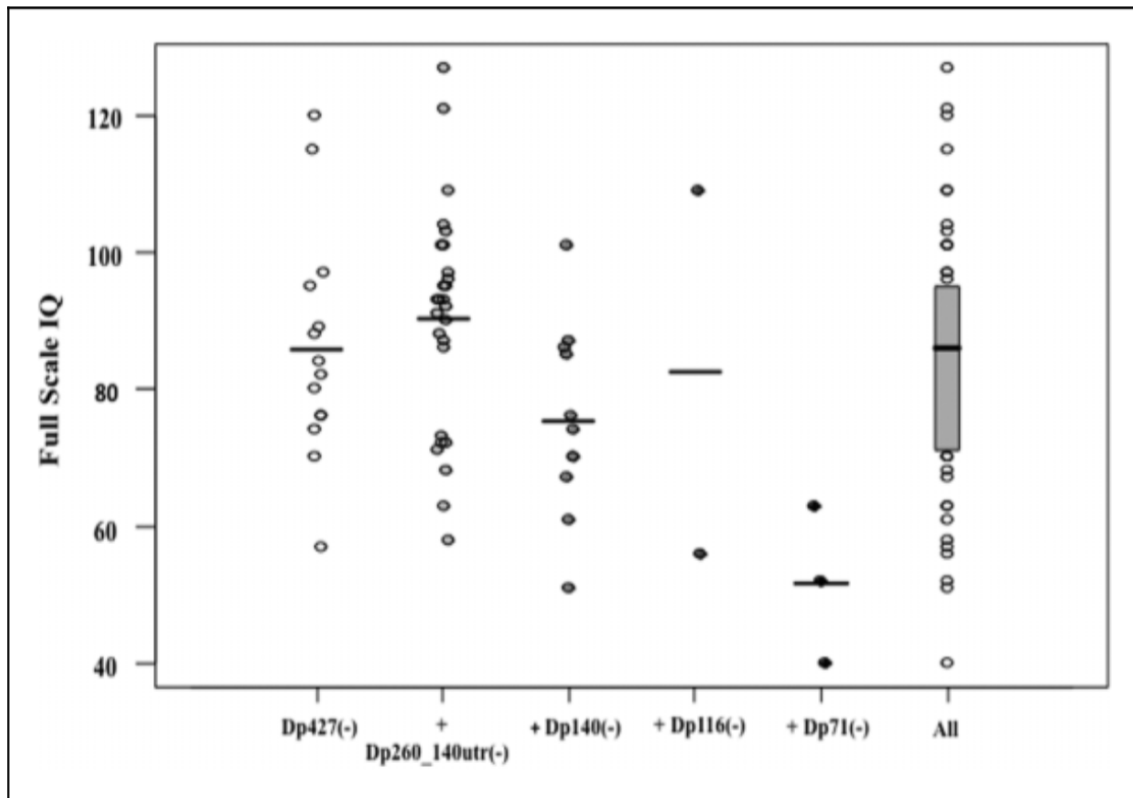


Figure 5 - FSIQ en fonction des dystrophines affectées.

La perte étant cumulative, le premier groupe est uniquement déficient en Dp427, le troisième en Dp427, Dp260 et Dp140 et ainsi de suite. Les lignes horizontales représentent la médiane. Pour le groupe incluant tous les patients (à droite), la boîte grisée inclue du premier au troisième quartile (Banihani *et al.*, 2015).

Cette figure est très intéressante car elle montre la variabilité du FSIQ chez les patients DMD (groupe de droite) ainsi que chez les sous-groupes de patients ayant une Dp427 et/ou 260 mutées. En revanche, la perte de Dp140 et/ou Dp71 impacte clairement le FSIQ.

c. Autres troubles comportementaux

Les études pionnières ci-dessus, liant quotient intellectuel et mutations sont aujourd'hui largement confirmées, particulièrement par les études que nous allons détailler ci-après.

Magri *et al.* (2011) ont étudié une large cohorte de 320 patients et décrit de très nombreux paramètres concernant les relations génotype-phénotype. Se focalisant sur la nature de la mutation (délétion, duplication ou mutation ponctuelle) et sur sa localisation (proximale ou distale -après l'exon 45-), ils ne trouvent aucun lien entre l'âge de perte de la marche, le taux circulant de créatine kinase, la fonction pulmonaire et cardiaque en fonction des mutations chez les patients DMD. Comme attendu, si la mutation vient à interrompre l'expression de la Dp140 et de la Dp71, le FSIQ est significativement plus faible. Chez les DMD, qui ont perdu totalement la forme longue de la dystrophine, seul l'âge est un facteur d'intérêt concernant l'évolution de la maladie musculaire. En revanche, ils montrent que chez les patients BMD, la nature et la position de la mutation va influencer sur beaucoup de paramètres biologiques (âge de perte de la marche, taux circulant de créatine kinase, fonction pulmonaire et cardiaque). Ils soulignent également l'importance de connaître avec

précision l'altération génétique de chaque patient dans le cadre des thérapies, notamment géniques.

La même année, une étude va s'intéresser au profil neurocognitif des patients DMD (D'Angelo *et al.*, 2011). Sans surprise, ils confirment la relation génotype-phénotype concernant la déficience intellectuelle. Plus précisément, ils notent que les patients présentant une mutation dans la partie distale du gène présentent de plus grands déficits dans les tâches verbales de mémoire à court et à long terme, de mémoire visuelle, dans l'organisation visuospatiale, dans l'analyse séquentielle et possiblement dans des tâches de mémoire de travail. Les patients présentant une mutation dans la partie proximale du gène, en revanche, expriment des difficultés dans le jugement social et la compréhension critique de phrases, déficits aussi observés chez des patients autistes, ainsi que dans des tâches d'attention visuelle. Ils vont étudier de façon plus précise que Billard *et al.* (1998) la relation entre la position de la mutation et les performances en lecture. Ils montrent que (1) les problèmes de lecture sont rencontrés chez tous les patients et reposeraient donc sur la fonction de la Dp427, mais semblent cependant avoir une cause différente en fonction de la mutation ; (2) si la mutation est dans la partie proximale du gène : les problèmes de lecture ne sont pas liés à une altération de la mémoire de travail ou de l'attention auditive, mais à l'altération de la mémoire visuelle et des processus cognitifs complexes (résolution de problèmes, compréhension) liés au langage (compétences lexicale et phonologique, syntaxe) ; (3) si la mutation est dans la partie distale du gène : les problèmes de lecture sont liés à la mémoire à long-terme et aux capacités d'apprentissage et d'organisation (logique ou séquentielle) des idées. Comme beaucoup d'auteurs avant eux, ils notent la complexité de tracer des liens directs entre génotype et phénotypes cognitifs, ayant dans leur cohorte un patient ayant perdu toutes les dystrophines (Dp140 et Dp71 incluent) qui ne présente pas de retard mental ou d'altération du QI verbal.

Nous avons vu précédemment que Wu *et al.* (2005) note, sur 158 patients, une comorbidité plus élevée entre DMD et autisme (3,8%) que dans une population saine, mais ils mettent également en évidence que sur les 8 patients présentant une mutation de la Dp140, 5 présentent un spectre autistique, ce qui représente une incidence de 62,5%. Egalement, Taylor *et al.* (2010) ne se limitent pas à l'étude du FSIQ, mais précisent que les mutations affectant la partie distale du gène entraîne un risque plus élevé de troubles comme l'ADHD, phénotype qui sera plus détaillé par Pane *et al.* (2012), qui révèlent que le risque d'ADHD est plus important lorsque la mutation affecte la Dp140 ou la Dp71.

Dystrophines mutées	Dp427 et/ou Dp260	Dp427, Dp260 et Dp140	Dp427, Dp260, Dp140 et Dp71
ADHD sans DI	12,9%	13,8%	10%
ADHD avec DI	9,6%	15,5%	60%
ADHD total avec/sans DI	22,5%	29,3%	70%

Figure 6 – Incidence de ADHD en fonction de la mutation

Pane *et al.* (2012) dissocient les groupes de patients DMD en fonction de la déficience intellectuelle (DI) et de la présence ou non d'ADHD. Cette figure est adaptée de leur article et présente les deux groupes rassemblés.

Une autre équipe (Banihani *et al.*, 2015) relève également que la mutation de la Dp140 et/ou de la Dp71 entraîne un risque accru de problème de lecture, d'ADHD et d'autisme chez les patients. L'étude de Ricotti *et al.* (2016) a déjà été présentée à plusieurs reprises dans ce manuscrit, car elle aborde tout autant le quotient intellectuel, l'autisme, le TDA/H, ou encore les problèmes émotionnels chez les patients DMD. Mais au-delà de ce large spectre cognitif, il faut à présent mettre en lumière le point crucial de l'étude : tous ces paramètres ont été analysés en prenant en compte la localisation de la mutation, par rapport à l'exon 30 (Dp427 mutée), entre les exons 31 à 62 (+ Dp260, Dp140 et Dp116 mutées) et au-delà de l'exon 63 (+Dp71 mutée). Naturellement, ils retrouvent l'impact d'une mutation au-delà de l'exon 63 avec l'aggravation de la déficience intellectuelle. Ce type de mutation aggrave le score au SCDC, un questionnaire visant à évaluer les compétences en communication et le comportement social. Le SCDC est généralement considéré comme une première étape possible au diagnostic de l'autisme, ne durant qu'une dizaine de minutes, avant d'envisager des tests plus poussés comme l'ADI-R, l'ADOS ou le 3Di (voir plus haut). La perte de la Dp71 semble aussi avoir un impact particulier sur l'index de mémoire de travail (un sous-index du WISC-IV). Par contraste, ces auteurs trouvent que les altérations émotionnelles sont uniformément réparties dans les sous-groupes, et que la perte de la Dp427 est suffisante pour induire des déficits cognitifs (déficience intellectuelle, mémoire de travail) et neurocomportementaux (hyperactivité, autisme).

d. Conclusion

Devant cette relation, plus que robuste, entre la perte des dystrophines cérébrales et les troubles intellectuels et neuropsychiatriques, la question de connaître précisément le profil d'expression de chaque dystrophine et de leurs partenaires d'interaction s'est posée. Il est connu que les différentes dystrophines n'ont pas les mêmes profils d'expression aux niveaux tissulaire et cellulaire, ni les mêmes partenaires, ce qui pourrait expliquer cette variabilité de symptômes dépendante de chaque forme susceptible d'être impliquée dans des mécanismes cérébraux et cognitifs différents.

II. Les dystrophines et leurs partenaires

Les altérations cognitives observées chez les patients, tantôt légères comme soulevé par E. Meryon (Emery et Emery, 2011) ou à l'inverse, plus marquées (comme décrites par le Dr. Duchenne, 1868) soulèvent l'hypothèse d'une altération au sein du système nerveux central, reposant probablement sur différentes dystrophines, qui vont être affectées, ou non, en fonction de la position de la mutation dans le gène *dmd*.

1. La famille des dystrophines

Les dystrophines sont des protéines participant à l'architecture de la cellule, faisant le lien entre le cytosquelette d'actine, la membrane plasmique par l'intermédiaire de protéines transmembranaires en interaction avec des protéines de la matrice extracellulaire.

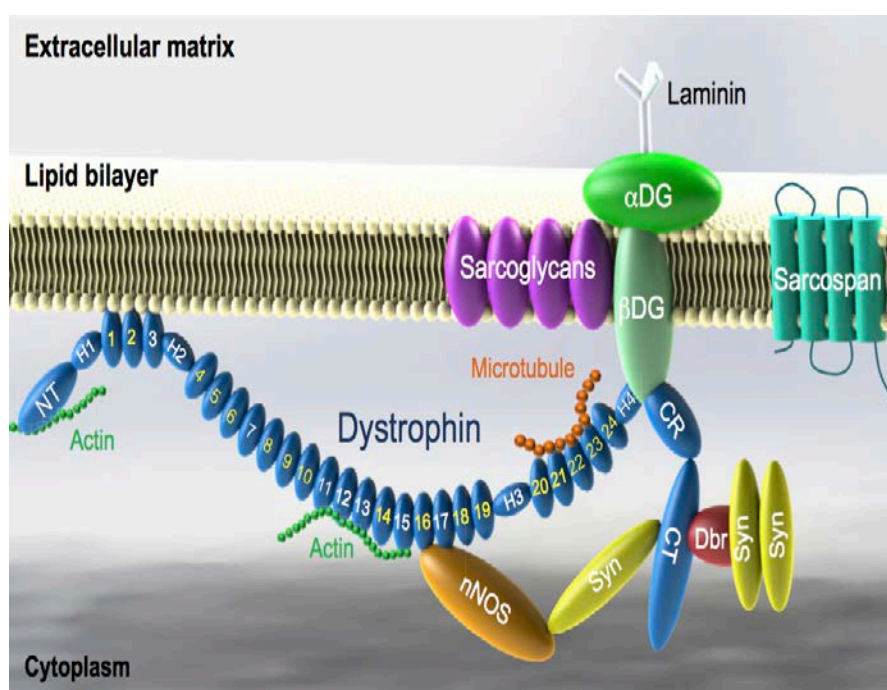


Figure 7 - Représentation schématique de la dystrophine et du complexe glycoprotéique associé aux dystrophines (dystrophin glycoprotein complex, DGC) dans le muscle squelettique.

La nomenclature pour la dystrophine est la même que celle de la Figure 3 (page 35). La dystrophine possède deux domaines d'interaction à l'actine en NT (exons 2-8) et aux hélices 11-15 (exons 32-41). Les hélices 1-3 (exons 10-16) interagissent avec la membrane plasmique, 16-17 (exons 42-45) avec l'oxyde nitrique synthase neuronale et 20-23 (exons 51-57) avec les microtubules. H4 (exons 61-64) et CR (exons 64-70) vont lier la sous unité β du dystroglycane. Enfin, le domaine CT (exons 70-79) interagit avec la syntrophine et la dystrobrevine. Les sarcoglycans et le sarcospane ne vont pas interagir directement avec la dystrophine mais vont renforcer le complexe (D'après McGreevy *et al.*, 2015 ; http://www.dmd.nl/DMD_home.html#protein).

Il faut envisager à présent la myopathie de Duchenne comme une maladie multi-protéique, où chaque forme de dystrophine va avoir son propre profil d'expression dans différents tissus et/ou types cellulaires, différents partenaires d'interaction en fonction de sa localisation et différentes fonctions.

a. La dystrophine complète ou Dp427

La dystrophine ou Dp427 est une protéine de 427 kDa, dont la partie carboxy-terminale non traduite (3'-UTR, jouant un rôle important dans la régulation de l'expression de la protéine) est très bien conservée entre les espèces (Lemaire *et al.*, 1988). Koenig *et al.*, en 1988, constatent que la séquence en acides aminés suppose une protéine de forme allongée, faisant partie du cytosquelette et associée à la membrane. Elle est composée de 4 domaines.

Trois domaines sont des homologues présents dans de nombreuses protéines du cytosquelette qui se lient à l'actine : le domaine amino-terminal (246 acides aminés) contient un module homologue à la calponine qui forme le domaine fonctionnel de liaison à l'actine. Le plus grand domaine (2 840 acides aminés) contient 24 triples hélices de type spectrine entrecoupées de quatre domaines charnières riches en résidus proline qui donnent à la dystrophine une forme flexible et allongée. Il est lui aussi capable de se lier à l'actine mais avec une plus forte affinité que le premier. Comme la délétion de cette région, lorsque le cadre de lecture reste préservé, conduit souvent à un profil clinique sain ou très modéré (myopathie de Becker), il est parfois simplement considéré comme un domaine intermédiaire entre le site de liaison à l'actine et le site riche en cystéine qui est le troisième domaine. Initialement nommé « domaine riche en cystéine » (280 acides aminés), ce troisième domaine code pour deux mains EF (permettant la liaison d'un ion Ca^{2+}) liés par des domaines WW (domaine d'interaction protéine-protéine contenant deux résidus tryptophane) et ZZ (domaine en doigt de zinc qui stabilise le domaine WW et les poignées EF et qui renforce l'interaction entre la dystrophine et le β -dystroglycane). Enfin, le domaine carboxy-terminal unique à la dystrophine et de structure proche de la dystrobrevine lui permet de se lier aux protéines cytoplasmiques telles que les dystrobrevines et les syntrophines. Ce domaine est donc essentiel à la liaison de la dystrophine à son complexe associé. Il existe, de plus, trois promoteurs internes qui régulent l'expression de dystrophines en fonction du tissu (cerveau, muscle ou cellules de Purkinje du cervelet ; Ervasti, 2007).

De nombreux sites de phosphorylation ont été identifiés au sein de la dystrophine, suggérant une régulation des sites de liaison à l'actine par des protéines endogènes telles que les protéines kinases A et C, la calmoduline II (CamKII) et la caséine II (CKII), tandis que les interactions avec le complexe associé aux dystrophines et les protéines de signalisation pourraient être modulées par CamKII, CKII, MAPK, cdc2 et GSK-3.

La dystrophine s'exprime à la membrane cellulaire dans le muscle squelettique mais est absente du nerf sciatique. Elle est également retrouvée dans le cœur (Arahata *et al.*, 1988; Byers *et al.*, 1991).

Lidov *et al.* ont été les premiers à détecter l'expression de Dp427 au niveau des densités postsynaptiques dans le cerveau et ils ont par la suite publié une étude très complète de la localisation de la Dp427 dans le cerveau en 1993. Son expression cérébrale a été confirmée chez le rat, l'humain et la souris *mdx* (Kim *et al.*, 1992 ; Kim *et al.*, 1995). La dystrophine est présente dans les neurones le long de la membrane plasmique et des dendrites proximales sous forme de points d'immunofluorescence. On la retrouve dans toutes les aires corticales (pariétale, pyriforme, cingulaire), dans les couches CA1–3 de

l'hippocampe, dans les strata radiatum et oriens, mais elle est absente des strata locunosum et moleculare. Elle est également supposée absente du striatum, du thalamus et de l'hypothalamus ainsi que de la moelle épinière. Comme attendu par l'existence d'un promoteur spécifique aux cellules de Purkinje du cervelet, elle y est très fortement exprimée. Knuesel *et al.* (1999) préciseront son absence dans le striatum (utilisant cette structure comme contrôle dans leurs expériences) levant le doute qu'exprimait Lidov vis-à-vis de son absence dans cette structure, et montreront surtout son expression dans les synapses inhibitrices GABAergiques des neurones pyramidaux.

Bien que nous connaissions assez précisément sa localisation dans les aires cérébrales, ainsi que sa localisation subcellulaire au niveau de la densité post-synaptique des synapses inhibitrices GABAergique, l'absence d'une étude détaillant la localisation cellulaire et subcellulaire de la dystrophine dans d'autres sous-structures cérébrales comme le caudé putamen, ou les noyaux accumbens (fortement impliqués dans les fonctions exécutives), manque actuellement dans la littérature.

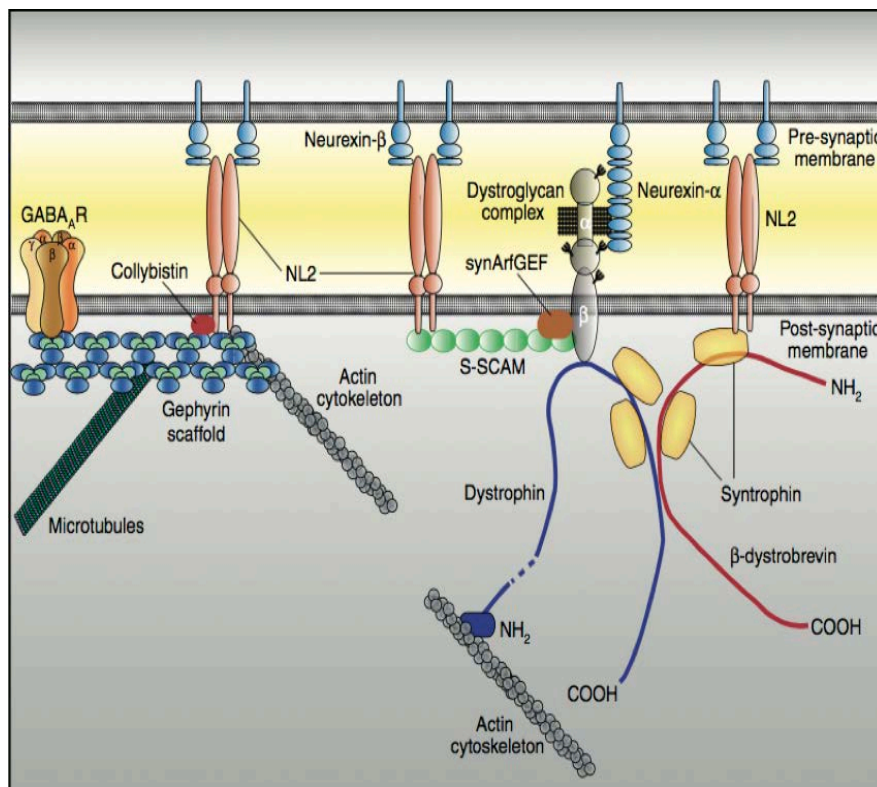


Figure 8 - La Dp427 dans les synapses inhibitrices GABAergiques

La dystrophine est en interaction avec, d'une part le cytosquelette d'actine et d'autre part avec la β -dystrobrevine, les syntrophines et l' α - et β -dystroglycane. Ces dernières vont interagir avec les α -neurexines et les neuroligines (NL2) transsynaptiques, formant le DGC. Par l'intermédiaire de S-SCAM et synArfGEF, ce complexe va venir stabiliser le regroupement des récepteurs GABA_A à la membrane, eux-même ancrés grâce à la gephyrine. (Waite *et al.*, 2012)

b. La Dp260

La Dp260 a été identifiée par Pillers *et al.* en 1993, de façon inattendue alors que leur étude portait sur le rôle de la Dp427 dans la rétine. Elle possède un premier exon spécifique dans l'intron 29 et sa partie amino-terminale ne diffère que de 13 acides-aminés

par rapport à la Dp427 (D'Souza *et al.*, 1995). La Dp260 est considérée comme la forme spécifique de la rétine, exprimée dans la couche plexiforme externe des cellules photoréceptrices (Wersinger *et al.*, 2011). Les patients l'ayant perdue présentent une altération de leur électrorétinogramme (en particulier de l'onde β , Fitzgerald *et al.*, 1994; 1999 ; Pillers *et al.*, 1999) ainsi qu'un déficit de perception des couleurs rouges et vertes (Costa *et al.*, 2007). De plus, son ARN est détecté par RT-PCR dans le système intestinal et le système reproducteur (Tokarz *et al.*, 1998).

c. La Dp140

Le promoteur de la Dp140 est situé dans l'intron 44 et produit un transcrit de 7,4 kb. La Dp140 est fortement exprimée dans le cerveau foetal, et peut-être dans le système gliovasculaire (Lidov *et al.*, 1995). Au cours de ses études, Lidov soulève la possibilité qu'elle soit responsable de l'augmentation de l'incidence des altérations cognitives chez les patients (Lidov et Kunkel, 1997 ; Lidov *et al.*, 1995), ce qui sera confirmé par la suite (Moizard *et al.*, 1998 ; Taylor *et al.*, 2010). Plus tard, il précisera que les parties carboxy-terminales de la dystrophine et de la Dp140 étant semblables, la Dp140 se lie probablement aussi à la matrice extracellulaire par l'intermédiaire du DGC, et pourrait jouer un rôle dans des anomalies rénales puisqu'elle est détectée aussi dans les reins. Tokarz *et al.* (1988) préciseront l'année suivante le profil d'expression de l'ARN de la Dp140 (cerveau, coeur, yeux, intestin, rein, foie, poumon, muscle squelettique, rate, estomac, testicules, thymus et utérus), qui montre des niveaux variables en fonction du tissu. Dodson *et al.* (1995) détectent également la Dp140 dans la cochlée. La Dp140 possède plusieurs isoformes : la Dp140b qui ne possède pas l'exon 78, la Dp140ab qui ne possède pas les exons 71 et 78, la Dp140c qui ne possède pas les exons 71 à 74 et la Dp140bc qui ne possède pas les exons 71 à 74 et 78 (Lidov *et al.*, 1995 ; Lidov et Kunkel, 1997).

d. La Dp116

Byers, *et al.* montrent en 1993 qu'une forme courte de la dystrophine issue d'un transcrit de 5,6 kb s'exprime spécifiquement dans les cellules de Schwann des nerfs périphériques et dans les densités post-synaptiques cérébrales. Le promoteur se situe 850 paires de bases en amont de l'exon 56 (à l'intérieur de l'intron 55). Ils nommeront Dp116 cette dystrophine de 116 kDa et confirmeront sa détection à l'aide des anticorps reconnaissant le carboxy-terminal de la dystrophine. La Dp116 ne possède pas de domaine de liaison à l'actine, ce qui semble indiquer une fonction différente de la dystrophine (Blake *et al.*, 1995).

e. La Dp71

Nudel *et al.* (1989) furent les premiers à détecter cette dystrophine courte. Remarquant que la protéine exprimée, dans le cerveau, ne possède pas l'extrémité 5' de la forme musculaire, ils posent l'hypothèse d'un épissage post-transcriptionnel ou d'un promoteur interne au gène, inconnu jusqu'alors. L'année suivante, Chelly *et al.* (1990) confirment l'hypothèse du promoteur interne qui est localisé entre les exons 62 et 63 et dont la

transcription donne un ARNm de 4,6 kb. A quelques mois d'intervalle, Bar *et al.* font la même découverte et supposent, du fait de son profil d'expression, son implication dans la déficience intellectuelle des patients. Deux ans plus tard, Lederfein *et al.* (1992) effectuent la caractérisation de la protéine, en revérifiant qu'elle n'est pas le produit d'un clivage de la Dp427, mais bien la résultante d'un promoteur interne au gène *dmd*. Ils retrouveront, de plus, son ARNm dans le foie, les muscles lisses de l'estomac, les testicules, les poumons, et le rein (Hugnot *et al.*, 1992 ; Blake *et al.*, 1992). La Dp71 semble jouer un rôle crucial durant le développement embryonnaire, en particulier au cours des événements morphogéniques et de la différenciation terminale de nombreux tissus et organes, tels que le système nerveux périphérique, les membres supérieurs et inférieurs, les poumons, les vaisseaux sanguins, les yeux, l'oreille interne, et le nez (Tokarz *et al.*, 1998). La Dp71 est fortement détectée au niveau du cerveau antérieur embryonnaire, qui donne par la suite naissance à l'hippocampe dans le cerveau adulte (Sarig *et al.*, 1999), où elle participe à la croissance des neurites (Acosta *et al.*, 2004). A l'âge adulte, son ARNm est fortement exprimé dans le gyrus denté de l'hippocampe, et dans une moindre mesure dans le cortex, le bulbe olfactif et la région CA-3 de l'hippocampe (Górecki et Barnard, 1995).

La Dp71 s'exprime surtout dans le cerveau, où elle est la forme majoritaire de dystrophine chez l'adulte, renforçant l'hypothèse du lien avec la déficience intellectuelle. Elle est détectée dans les myoblastes mais elle est réprimée durant la myogénèse et son expression totalement absente dans le muscle différencié du fait de la répression des facteurs de transcription Sp1 et Sp3 (de León *et al.*, 2005). Cette abolition d'expression est importante car si on force l'expression de Dp71 par génie génétique, un phénotype dystrophique apparaît, la forme courte entrant en compétition avec la Dp427, en la remplaçant au niveau du sarcolemme et du DGC (Leibovitz *et al.*, 2002). Initialement appelée apo-dystrophine-1, puis G-dystrophine, elle finira par s'appeler Dp71.

La Dp71 ne possède pas le domaine spectrine, mais conserve le domaine carboxy-terminal ainsi que celui riche en cystéine. Le site encodé par le premier exon spécifique de la Dp71 interagit avec celui de l'exon 63 et forme un site de liaison non-canonique à l'actine inexistant dans les autres formes de dystrophines (Howard *et al.*, 1998). La liaison avec le DGC reposant sur la partie carboxy-terminale, la Dp71 serait bien un composant clef de celui-ci, mais nous savons aujourd'hui que le DGC associé à la Dp427 n'est pas le même que celui associé à la Dp71 (Blake *et al.*, 1999). La Dp71 est associée avec les α et β -dystrobrevines, α et β -syntrophines dans les densités post-synaptique, tandis que l'équipe de Rendon (Jung *et al.*, 1993) a montré qu'elle s'associe avec le β -dystroglycane, le δ -sarcoglycane et l' α 1-syntrophine au niveau de la membrane synaptique, des microsomes et dans une moindre mesure, dans les vésicules synaptiques et les mitochondries (Jung *et al.*, 1993 ; Chávez *et al.*, 2000). Daoud *et al.* ont montré en 2009 que la Dp71 colocalise avec les protéines clefs des synapses excitatrices glutamatergiques, tels que les récepteurs NMDA et AMPA. Sa forte expression au niveau de l'interface glio-vasculaire, dans les pieds astrocytaires, semble indiquer un rôle dans la barrière hémato-encéphalique qui est compromise lors d'une sous-expression de la Dp71 (Nico *et al.*, 2004). Cette dernière hypothèse est largement soutenue par les altérations de la barrière hémato-

rétinienne observées chez la souris déficiente en Dp71 (Sene et al., 2009 ; Vacca et al., 2016). La Dp71 jouerait aussi un rôle au cours de la différenciation des astrocytes (Imamura et Ozawa, 1998) et dans la formation des myoblastes, notamment via son interaction avec le cytosquelette d'actine (Howard et al., 1999). Dans les astrocytes cérébraux, ainsi que dans les gliales de Müller dans la rétine (Claudepierre et al., 1999), la Dp71 est associée aux canaux potassiques Kir4.1 et aux canaux aqueux AQP4 (Guadagno et Moukhles, 2004).

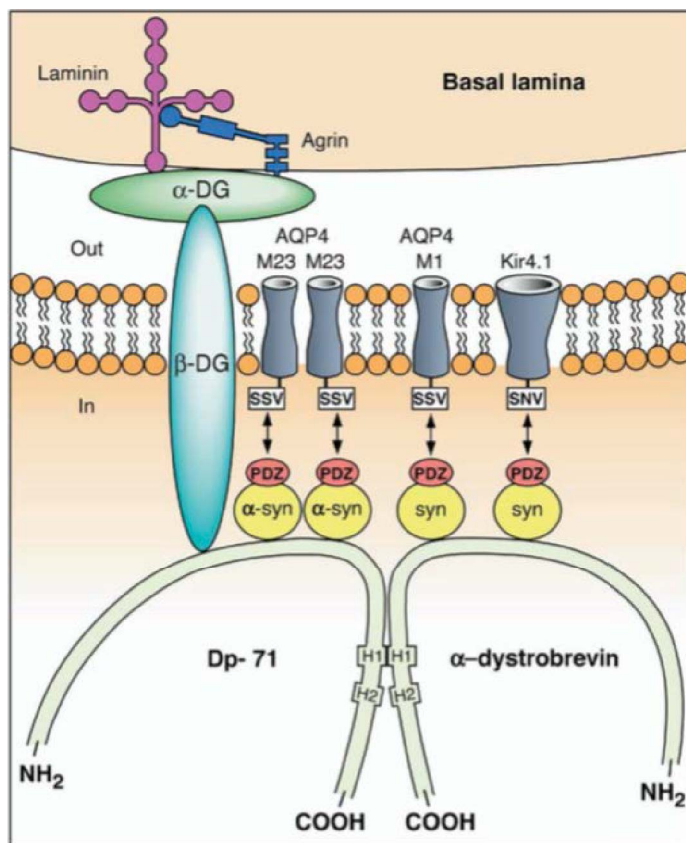


Figure 9 - DGC associé à la Dp71 dans les astrocytes périvasculaires

Le DGC incluant la Dp71, le dystroglycane et la syntrophine, est présent au niveau des pieds des astrocytes périvasculaires, en interaction avec des isoformes particuliers (M23, M1) de l'AQP4 et Kir4.1 (dont la stoechiométrie est variable, SSV et SNV) par l'intermédiaire de domaines PDZ. L'interaction entre syntrophines et AQP4/Kir4.1 est probablement indirecte (double flèche). La Dp71 se lie à l'α-dystrobrevine par ses domaines H1 et H2. Le DGC est en interaction indirecte avec la lame basale par l'intermédiaire de l'α-dystroglycane, lui-même en interaction avec la laminine et l'agrine (de Amiry-Moghaddam *et al.*, 2004).

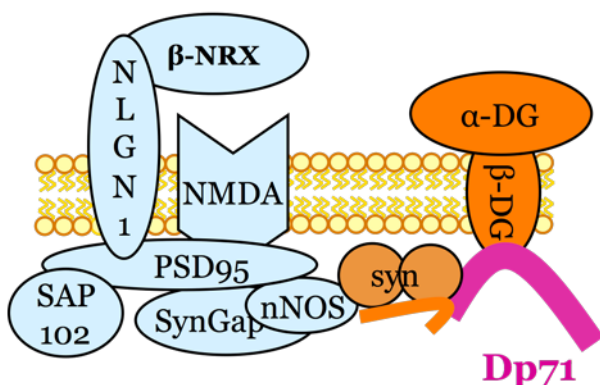


Figure 10 - DGC associé à la Dp71 dans la synapse excitatrice : modèle de travail

Ce complexe interagirait de manière indirecte avec le complexe associé aux récepteurs du glutamate (NMDA) du fait d'interactions entre les syntrophines (ronds orange) avec la nNOS. La perte de Dp71 pourrait déstabiliser ce complexe (Daoud *et al.*, 2009). Une altération du complexe trans-synaptique des neurexines (NRX)-neuroligines (NLGN) est suspectée (D'après les résultats de Daoud *et al.*).

On sait aujourd'hui que la Dp71 se compose d'au moins 3 groupes distincts d'isoformes, se différenciant par des épissages d'exons spécifiques et parfois d'ajout de séquences introniques (Austin *et al.*, 1995 ; Aragón *et al.*, 2011 ; Saint Martín *et al.*, 2012). Aragón *et*

al. (2017) ont récemment découvert 4 nouveaux isoformes de Dp71 et proposent une nouvelle nomenclature pour la Dp71 comme présenté dans la Figure 11 - Représentation schématique des isoformes de la Dp71, ci-dessous).

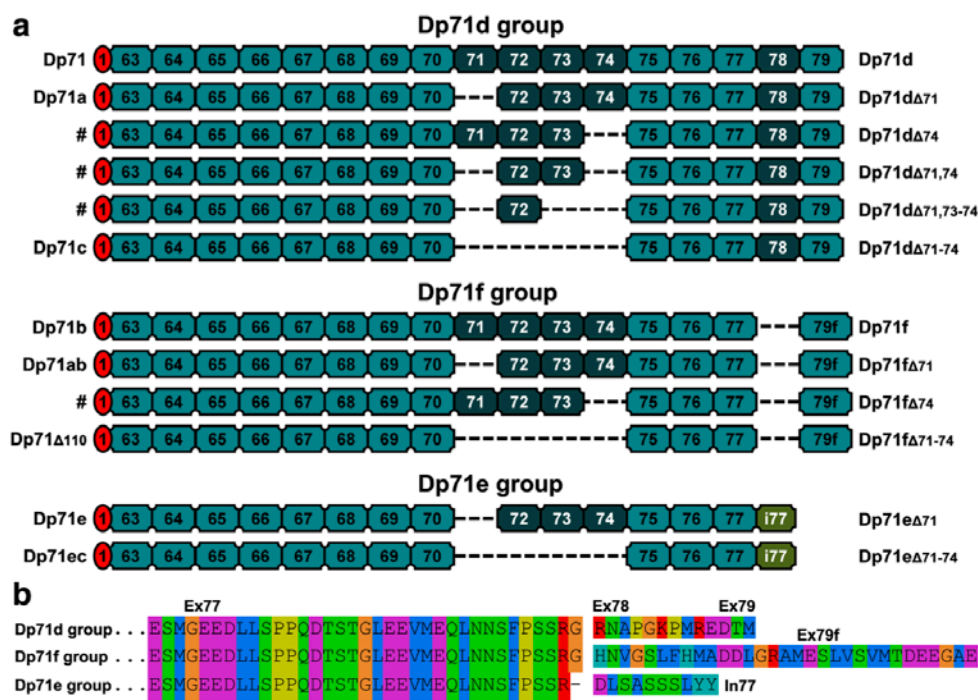


Figure 11 - Représentation schématique des isoformes de la Dp71

(a) Groupes des isoformes de la Dp71 (Dp71d, Dp71f et Dp71e). Le groupe Dp71d se caractérise par la présence des exons 78 et 79, le groupe Dp71f a perdu l'exon 78 et possède un exon 79 alternatif (79f) tandis que le groupe Dp71e possède l'intron 77 (i77) et a perdu les exons 78 et 79 dans sa forme protéique. Les lignes pointillées indiquent les épissages alternatifs. Le nom usuel des isoformes est présenté à gauche, les auteurs proposant une nouvelle nomenclature plus simple et claire à droite, qui préserve la lettre indiquant l'appartenance à une sous-famille (d, f, e) puis précise la liste des exons épissés (précédé du symbole delta). Le symbole # indique les isoformes nouvellement découverts en 2017. (b) Alignement des acides aminés des exons 77, 78 et 79 pour les différents groupes, qui possèdent un domaine C-terminal spécifique du fait de l'épissage ou non de l'exon 78 ou de l'intron 77. Les exons (Ex), exon 79 alternatif (Ex79f) ou l'intron 77 (In77) sont indiqués (Aragón *et al.*, 2017).

Le rôle spécifique de chacun de ces isoformes reste encore très mal connu. Ils semblent pouvoir s'exprimer de manière différentielle aux niveaux tissulaire, cellulaire et/ou subcellulaire et pourraient ainsi jouer un rôle dans des mécanismes très différents, voire à différents moments au cours du développement ou du fonctionnement cérébral adulte. Pendant longtemps, la Dp71 a été considérée comme une protéine uniquement cytoplasmique associée à la membrane des cellules, les observations de sa présence dans le noyau de la cellule étant considérées comme des artefacts d'observations. Pourtant, González *et al.* (2000) et Aleman *et al.* (2001) vont apporter des preuves solides remettant en cause ce dogme. Ils ont trouvé les Dp71d et Dp71f dans des extraits nucléaires de neurones hippocampaux. On la retrouve également jouant un rôle dans le cycle cellulaire et la mitose, durant les phases G0/G1 (Villarreal-Silva *et al.*, 2011), et donc au cours de la prolifération cellulaire (Romo-Yáñez *et al.*, 2011 ; Herrera-Salazar *et al.*, 2016), son expression étant également régulé par HSF1 (Tan *et al.*, 2015), protéine de choc

thermique dont la participation dans certaines formes de cancer, les mélanomes malins, a été démontrée (Scott *et al.*, 2011).

La Dp71 semble donc avoir une expression presque ubiquitaire mais régulée de manière très complexe dans l'organisme et pourrait donc participer à une grande variété de fonctions de bases ou très spécialisées dans différents types cellulaires. Son étude ne concerne plus uniquement son rôle dans la myopathie de Duchenne et son importance ne fait que grandir au fil des découvertes.

f. La Dp40

La Dp40, issue du clivage de la Dp71 n'est donc pas exprimée à partir d'un promoteur spécifique interne au gène mais d'un épissage (Tinsley *et al.*, 1993), son ARNm est de 2,2 kb. La Dp40 se compose de 341 acides aminés. C'est le plus petit produit du gène *dmd* connu de la dystrophine. Cette protéine est unique car elle ne possède pas le carboxy-terminal commun aux autres dystrophines, qui était la cible privilégiée des anticorps, empêchant sa détection et sa localisation cellulaire précise. L'équipe de Tozawa *et al.* a mis au point, en 2012, un anticorps capable de reconnaître la Dp40. Elle est exprimée abondamment dans le cerveau mais n'interagit que peu avec le β -dystroglycane. Cette affirmation a été récemment mise en doute par l'équipe de Aragón *et al.* (2015) vu que la Dp40 contient un domaine d'interaction avec le β -dystroglycane. Une hypothèse semble être que cette protéine est impliquée dans un complexe indépendant de celui des dystrophines. Initialement suspectée de participer à la régulation de l'exocytose des vésicules présynaptiques, interagissant avec la syntaxine 1A, l'expression présynaptique de la Dp40 est controversée (Fujimoto *et al.*, 2014). Les auteurs de l'étude concluent qu'il est possible qu'une partie des fonctions aujourd'hui associées à la Dp71, sont en réalité à associer à la Dp40.

g. Conclusion

Du concept de dystrophine unique, aujourd'hui c'est le terme de « famille des dystrophines » qui est plus souvent utilisé, au vu des nombreux promoteurs internes au gène et des épissages multiples qui semblent pouvoir affecter toutes les dystrophines. L'ensemble de ces données suggère une multiplicité des rôles des dystrophines, dans de nombreux tissus. Mais, il reste encore beaucoup d'inconnues les concernant, au niveau de leur localisation comme de leur fonction et de leurs partenaires d'interaction.

2. Les complexes protéique et glycoprotéique associés aux dystrophines

Les dystrophines sont associées à un complexe glycoprotéique (DGC) formé d'au moins dix partenaires codés par des gènes autosomiaux, incluant des protéines transmembranaires et extracellulaires (complexe des dystroglycanes) et à un complexe protéique cytosolique (DPC : syntrophines, dystrobrevines). Ces complexes assurent à la fois un lien entre le cytosquelette d'actine et la lame basale et des interactions avec des

protéines de signalisation et des protéines membranaires (canaux, récepteurs), offrant un pont moléculaire connectant l'intérieur de la cellule à la matrice extracellulaire (MEC). Initialement identifié en association avec la Dp427 dans les cellules musculaires, le DGC/DPC est aujourd'hui également vu comme un échafaudage pour les protéines impliquées dans la stabilisation membranaire et la signalisation transmembranaire de plusieurs types cellulaires dans le SNC. De plus, différentes isoformes de chaque composant du DGC/DPC sont distribuées dans des types cellulaires distincts dans le cerveau, où ils forment des complexes séparés assurant différentes fonctions (Waite *et al.*, 2009).

a. Les dystroglycanes

La partie centrale du DGC est le complexe des dystroglycanes, composé de deux protéines (α et β dystroglycanes) historiquement décrites par Smalheiser et Schwartz (1987) sous le nom de « cranines » (et aussi par Ervasti *et al.* en 1990). C'est Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.* (1992) qui suggéreront le nom « dystroglycanes » pour **dystrophin-associated glycoproteins**. Ils montreront que ces protéines sont ubiquitaires et codées par un seul chromosome (3p21) via un transcrite de 5.8 kb ensuite clivé en deux glycoprotéines : α - et β -dystroglycane.

Le β -dystroglycane (43 kDa) est une protéine transmembranaire qui va relier la dystrophine à l' α -dystroglycane. L' α -dystroglycane (120 kDa dans le cerveau, 156 kDa dans le muscle) est quant à elle une protéine extracellulaire, faisant le lien entre le β -dystroglycane et des protéines de la matrice extracellulaire comme la lamine, composant principal de la lame basale musculaire, mais également dans le SNC avec les neurexines, protéines transynaptiques liées aux neuroligines et fortement impliquées dans la synaptogenèse et ayant un rôle dans l'autisme.

L'importance physiologique de ces molécules se traduit par l'impossibilité de créer un modèle murin knock-out des dystroglycanes, celui-ci étant létal (Williamson *et al.*, 1997). De fait, a été mis au point un knock-out conditionnel qui conduit notamment à des déficits de plasticité synaptique dans l'hippocampe (Moore *et al.*, 2002). La perte de glycosylation, par génie génétique ou mutation naturelle, de l' α -dystroglycane, entraîne son incapacité à se lier à ses partenaires extracellulaires, ce qui conduit à des altérations critiques de la membrane plasmique et à des migrations neuronales anormales lors du développement cérébral. L'hypoglycosylation de l' α -dystroglycane due à des mutations des glycosyltransférases conduit aux syndromes de Walker-Warburg (WWS), Fukuyama (FCMD) et Muscle-Eye-Brain (MEB), connus pour être des dystrophies musculaires congénitales (CMDs) associées à des altérations cérébrales. Ces dystroglycanopathies conduisent à une désorganisation totale du cortex cérébral et à une déficience intellectuelle (voir Muntoni *et al.*, 2004 pour une revue). Il existe également des dystroglycanopathies correspondant à des CMD et des LGMD sans malformations cérébrales, avec ou sans atteinte cognitive. Il existe un continuum entre des CMD très sévères avec malformations cérébrales et des LGMD aussi symptomatiques. Enfin, le β -dystroglycane interagit avec la protéine adaptatrice Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2), suggérant un rôle dans la transduction des signaux extracellulaires, ainsi qu'avec la FAK (focal adhesion kinase)

dans le système nerveux central, qui est impliquée dans la croissance des neurites, la morphogenèse des épines dendritiques et la plasticité synaptique (Cavaldesi *et al.*, 1999).

b. Le complexe sarcoglycane-sarcospane

Les sarcoglycanes sont des protéines transmembranaires glycosylées à leur extrémité amino-terminale avec un court domaine intracellulaire, un unique domaine transmembranaire et un grand domaine carboxy-terminal extracellulaire contenant une région riche en cystéine. Cinq protéines constituent ce complexe dans le muscle : α -, β -, γ -, δ -sarcoglycanes et le sarcospane (Crosbie *et al.*, 1999). Le complexe est intégré à la membrane, liant le β -dystroglycane. A l'inverse du complexe des dystroglycanes –*retrouvé dans pratiquement tous les types cellulaires*–, les sarcoglycanes ont initialement été détectés uniquement dans le muscle et les nerfs périphériques. Claudepierre, *et al.* (2000), Boulay *et al.* (2015) et Zhou *et al.* (2008) ont cependant soulevé l'hypothèse d'une expression centrale, bien qu'elle puisse n'être limitée qu'au système vasculaire. Néanmoins, des études récentes révèlent l'existence de deux nouvelles formes de sarcoglycanes, la forme ϵ (Ettinger *et al.*, 1997 ; McNally *et al.*, 1998) détectée dans les neurones dopaminergiques et impliquée dans la dystonie myoclonique⁹ (Waite *et al.*, 2016) et la forme ζ dont on ignore la fonction (Wheeler *et al.*, 2002). Il s'associe en général en complexe de 4 sous-unités dont la composition varie en fonction du tissu (Waite *et al.*, 2009 ; Anastasi, *et al.*, 2012).

Ce complexe sert à renforcer la liaison entre le β -dystroglycane et la dystrophine en venant s'insérer de façon latérale dans la membrane (Humphrey *et al.*, 2015). Cette configuration suggère que ce complexe permet de stabiliser le lien entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule (Waite *et al.*, 2009). Les recherches sur les sarcoglycanes sont vastes, la mutation de cette famille de protéine entraînant des formes particulières de myopathie : les sarcoglycanopathies.

Le sarcospane (Crosbie *et al.*, 1999) est la dernière protéine du complexe à avoir été découverte. Elle est exprimée par le chromosome 12, au locus 11.2, codant pour un transcrite de 6.5 kb présent exclusivement dans le muscle squelettique et cardiaque, ainsi que pour un transcrite de 4.5k b plus largement exprimé dans l'organisme (muscle cardiaque, colon, ovaire, prostate, intestin grêle, rate, testicule et thymus).

c. Le complexe syntrophine-dystrobrevine

Les dystrobrevines sont des protéines de 87-94 kDa qui sont des paralogues de la dystrophine, du fait de leur homologie structurale avec le domaine carboxy-terminal des produits du gène *dmd*. L' α - et la β -dystrobrevine sont codées par deux gènes autosomiaux distincts et possèdent de nombreux isoformes. Les dystrophines et les dystrobrevines peuvent lier jusqu'à quatre syntrophines, qui à leur tour vont interagir avec une variété de protéines membranaires clefs. La dystrobrevine peut également se lier avec la dysbindine,

9. La dystonie myoclonique associe des contractions musculaires brèves et rapides (myoclonie) entraînant des mouvements anormaux aboutissant à des anomalies posturales (dystonie). La maladie est souvent associée avec des troubles dépressifs, obsessionnels compulsifs, troubles de la personnalité et crises de panique. La plupart des troubles disparaissent lors d'ingestion d'alcool.

qui a soulevé un grand intérêt depuis que des études récentes la qualifient de gène de susceptibilité pour la schizophrénie, notant son rôle dans l'assemblage et l'adressage du DGC ainsi que son rôle potentiel de régulateur du cycle des vésicules synaptiques dans les synapses centrales glutamatergiques.

L' α -dystrobrevine est une forme musculaire, également présente dans les astrocytes périvasculaires ainsi que dans la glie de Bergmann en association avec la Dp71, tandis que la β -dystrobrevine est exprimée dans le cerveau, notamment dans les densité post-synaptique du cortex, hippocampe et cervelet (particulièrement au niveau des cellules granulaires et de Purkinje) et d'autres tissus (foie, rein et poumon), mais est absente du muscle (Blake *et al.*, 1999). Plus particulièrement, la β -dystrobrevine, tout comme la dystrophine est retrouvé dans les neurones du cortex et de l'hippocampe et semble être en interaction avec la Dp71 et la Dp140 (Blake *et al.*, 1998).

Les syntrophines sont une famille hétérogène de protéines adaptatrices de 59 kDa, qui interagissent avec la dystrophine, l'utrophine et l' α -dystrobrevine. Cinq formes de syntrophine ont été décrites : α -, β 1-, β 2-, γ 1-, γ 2-syntrophines.

Les formes α et β 1 sont fortement exprimées dans le muscle squelettique et cardiaque mais plus faiblement le cerveau à l'inverse de la forme β 2. Les formes γ ont un profil différent, semblant jouer un rôle crucial au niveau cérébral, particulièrement dans les cellules pyramidales de l'hippocampe, les neurones corticaux ainsi que les cellules de Purkinje du cervelet (Alessi *et al.*, 2006). On les retrouve également associées à la nNOS (neuronal nitric oxide synthase, uniquement pour les formes α et β 1-2), à la PSD95 (Brennan *et al.*, 1996), à l'aquaporine 4 (AQP4 ; Adams *et al.*, 2001 ; Neely *et al.*, 2001), à divers canaux ioniques comme les canaux potassiques Kir2 (Leonoudakis *et al.*, 2004) et Kir4.1 (Connors *et al.*, 2004), à des canaux sodiques voltage-dépendants dans le muscle et le cerveau (Gee *et al.*, 1998), mais également à des protéines synaptiques comme les neuroligines ou la calmoduline et à des kinases (dans les neurones de Purkinje du cervelet notamment : Hogan *et al.*, 2001). Les mutations qui perturbent leur lien aux neuroligines ont été associées à l'autisme, ce qui confirme leur rôle fonctionnel important dans la fonction synaptique (Yamakawa *et al.*, 2007). Dans le cerveau, elles servent d'adaptateurs qui vont recruter des protéines de signalisation à la membrane, faisant de cette famille un acteur clef dans l'organisation membranaire et les fonctions de signalisation dans le cerveau.

3. Conclusion

Cette synthèse a été l'occasion d'aborder les aspects moléculaires des dystrophines et de leurs partenaires d'interaction. Des évidences claires relient toutes ces protéines avec diverses myopathies ou troubles neuropsychiatriques. Le prochain chapitre de cette introduction (III. Les modèles expérimentaux, page 53) détaillera l'apport des modèles animaux déficients en dystrophines sur ces questions et en particulier sur le rôle fonctionnel des dystrophines dans le cerveau.

III. Les modèles expérimentaux

1. Présentation générale

Actuellement, il existe deux types de modèles animaux de la DMD : ceux qui présentent une mutation spontanée ou induite par mutagenèse chimique dans le gène de la dystrophine, et ceux qui ont été générés artificiellement par génie génétique.

Près de 60 modèles animaux de la DMD existent, et la liste ne cesse de s'agrandir. Ils incluent tout autant des modèles non-mammifères comme le ver *C. elegans*, la *drosophile*, ou le *zebrafish* et des mammifères comme la souris, le chat, le chien, et plus récemment le rat ou le cochon (McGreevy *et al.*, 2015).

Les modèles canins de la myopathie de Duchenne sont décrits depuis plus de 50 ans dans la littérature et ~20 races différentes sont concernées. Leur phénotype musculaire est beaucoup plus proche de celui de l'humain, devenant *de facto* un bon modèle d'étude pour les thérapies visant à rétablir l'expression de la dystrophine dans le muscle. De plus, les réponses immunitaires du chien sont plus proches de l'Homme et sa plus grande taille permet de mieux appréhender les effets d'un traitement sur un individu de grande taille.

Malgré tout, c'est le modèle murin qui est le plus largement utilisée à la fois pour l'étude du rôle fonctionnel des dystrophines, l'étude des déficits cognitifs associés ainsi que pour le développement des nouvelles thérapies.

Il existe aussi de nombreux modèles murins dits « double knock-out », où la perte de dystrophine est associée à la perte d'au moins une autre protéine, généralement un paralogue susceptible de compenser la perte de dystrophine (e.g., utrophine) ou une protéine en interaction avec la dystrophine, afin d'étudier le rôle du complexe glycoprotéique associé aux dystrophines (les figures supplémentaires de McGreevy *et al.*, 2015 reviennent en détails sur ces lignées).

Le modèle historique est la souris *mdx*, dont seule la dystrophine Dp427 est mutée, ce qui en fait un bon modèle du point commun à tous les patients myopathes. La souris Dp71-null est également un modèle intéressant, car la perte de Dp71, seconde dystrophine cérébrale, joue un rôle dans la déficience intellectuelle associée à la myopathie.

2. La souris *mdx* : modèle des altérations communes à tous les patients ?

Le modèle le plus largement utilisé pour l'étude de la myopathie de Duchenne est la souris *mdx* (C57BL/10ScSn-Dmd^{*mdx*}/J), découverte au début des années 1980 dans une colonie de C57BL/10ScSn/J du fait de son taux circulant de créatine kinase¹⁰ élevé. Par la suite, des preuves histologiques et génétiques sont venues confirmer le diagnostic (Ryder-Cook *et al.*, 1988 ; Sicinski *et al.*, 1989). Une mutation non-sens ponctuelle (cytosine en thymine)

10. La créatine kinase est une enzyme qui va catalyser la conversion de la créatine en phosphocréatine par utilisation d'une molécule d'ATP qui est convertie en ADP + P. Cette réaction se fait en sens inverse lors de l'effort musculaire laissant place à la dégradation du glucose en acide lactique. Ainsi un fort taux de créatine kinase circulant révèle une lésion tissulaire du muscle.

introduisant un codon stop dans l'exon 23 de la dystrophine est responsable de la myopathie chez cette souris, entraînant l'absence sélective de la forme complète de la dystrophine à la fois dans le muscle et le cerveau (Sicinski *et al.*, 1989).

En 1989, quatre variant chimiques (chemical variant, cv) ont été créés. Ces souris, de fond génétique C57/BL6, ont été nommées mdx^{2cv} , mdx^{3cv} , mdx^{4cv} , et mdx^{5cv} . L'utilisation du mutagène N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) a permis d'induire de manière aléatoire de nouvelles mutations ponctuelles dans le gène *dmd* (Chapman *et al.*, 1989).

Modèle	Mutation	Dystrophines supposées mutées
mdx^{2cv}	intron 42	Dp427, Dp260
mdx^{3cv}	intron 65	Toutes
mdx^{4cv}	exon 53	Dp427, Dp260, Dp140
mdx^{5cv}	exon 10	Dp427

Figure 12 - Sites de mutation et dystrophines affectées dans différentes lignées *mdx*
(Chapman *et al.*, 1989 et Im *et al.*, 1996)

Le profil musculaire de ces modèles varie peu par rapport à la *mdx*, mais chacune présente tout de même des spécificités. La mdx^{3cv} exprime uniquement ~5% d'une Dp427 presque intacte et un phénotype musculaire moins sévère (Cox *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2008), la mdx^{5cv} présente un phénotype musculaire plus sévère (Beastrom *et al.*, 2011) et on observe peu de fibres révertantes chez les mdx^{4cv} et mdx^{5cv} (Danko *et al.*, 1992). La souris mdx^{4cv} est utilisée pour l'étude de la cardiomyopathie (Decrouy *et al.*, 1997).

La souris *mdx* ne présente pas de trouble de l'ERG (Cibis *et al.*, 1993) au contraire de la souris mdx^{3cv} déficiente pour toutes les formes de dystrophines (Pillers *et al.*, 1995). Bien que forts intéressants, peu d'études se sont intéressées à ces variants chimiques, préférant le modèle *mdx*.

a. Fonctions motrices

Bien que déficiente en dystrophine, la souris *mdx* a des symptômes cliniques très modérés et son espérance de vie n'est réduite que de ~25% (Pastoret et Sebillé, 1995) par comparaison à l'espérance de vie humaine qui est réduite de 75%. On distingue différentes phases en ce qui concerne la dégradation musculaire : dans les deux premières semaines, aucune lésion n'est détectable. Entre 3 et 6 semaines, une nécrose commence à se mettre en place. Suite à cela, une forte phase de régénération musculaire, beaucoup plus prononcée que chez l'humain, permet de la compenser, entraînant un phénotype musculaire hypertrophique. Lors d'une coupe musculaire, on observe une majorité de cellules musculaires non-matures possédant leur noyau cellulaire au centre du cytoplasme, par opposition à une cellule musculaire mature polynucléée où les noyaux sont en périphérie. La seule exception est le diaphragme qui se détériore progressivement comme chez l'humain (Stedman *et al.*, 1991). Une détérioration musculaire, scoliose ou arrêt

cardiaque n'est observé que passé 15 mois et plus (l'espérance de vie d'une souris étant comprise entre 24 et 36 mois).

Rafael *et al.* (2000) ont également mis en évidence que la souris *mdx* présente une fatigabilité augmentée. Ce qui est aujourd'hui remis en cause, l'interprétation de cette fatigabilité reposant probablement en partie aussi sur une réponse de peur qui s'exprime par une immobilité tonique (*freezing*), que nous allons détailler par la suite (c. Réponse de stress non conditionnée suite à une contention, page 55). Grady *et al.* (2006) montrent un comportement moteur anormal, à la fois dans un test de la force musculaire, qui est réduite d'environ 30%, mais également dans un test de coordination motrice sur un rotarod. Le rotarod est un cylindre qui peut tourner sur lui-même, à vitesse constante ou avec une accélération progressive. Tandis que la souris *mdx* conserve son équilibre à vitesse constante, elle réussit moins bien le test que des souris contrôles lorsque la vitesse augmente progressivement, reflétant sa faible force musculaire et peut-être aussi un déficit de coordination motrice dépendant du cervelet.

Souvent critiquée pour cette myopathie tardive, la souris *mdx* reste cependant un modèle de choix car elle mime le point commun de tous les patients : la perte de la dystrophine Dp427. Et en particulier pour les études comportementales visant à évaluer des altérations cérébrales et cognitives, le retard de progression de la myopathie est un avantage.

b. Fonctions locomotrice et exploration

L'activité locomotrice spontanée chez la souris est un élément essentiel. En milieu naturel, ce comportement permet la recherche de nourriture et en laboratoire, de nombreux tests comportementaux se basent sur cette modalité. Bien étudier son intégrité est nécessaire afin de bien interpréter les résultats : *sont-ils une conséquence de l'altération musculaire ou la résultante d'une altération cognitive ?* La question est toujours ouverte, cependant de nombreuses études arrivent à identifier des problèmes spécifiques, souvent en travaillant avec des souris jeunes, qui ne présentent pas de myopathie apparente. Vaillend *et al.* (2004) montrent des déficits d'exploration dans un champ ouvert, test qui induit un conflit naturel entre la tendance à explorer l'environnement et l'évitement de la zone centrale, plus éclairée et exposée donc anxiogène. Ce déficit observé reflète donc deux composantes distinctes : motricité et émotivité. Des indices spécifiques sont utilisés pour tenter de dissocier les deux. Par exemple, un bon indice d'émotivité est le ratio entre la distance parcourue au centre et la distance totale parcourue.

c. Réponse de stress non conditionnée suite à une contention

Le phénotype le plus robuste chez la souris *mdx* est sa réponse suite à un stress induit par une contention. On suppose qu'il s'agit d'un phénotype dépendant de l'amygdale, cette structure pourrait donc être altérée par la perte de Dp427. La contention est une méthode visant à entraver la mobilité du sujet d'étude, pour réaliser une injection ou regarder sa bague d'identification, présente à l'oreille dans notre laboratoire. Chez la souris, elle se réalise en attrapant la peau du dos afin d'empêcher la mobilité des pattes et de la tête. Bien réalisée, la contention vise uniquement à immobiliser et n'est pas douloureuse.

Suite à ce stress aigu chez la souris *mdx*, mais pas chez la souris WT, on peut observer une réponse d'immobilité, dite de « *freezing* », qui est définie par une immobilisation totale de l'animal en dehors des mouvements liés à la respiration. Sekiguchi *et al.* (2009) ont montré que la réponse de *freezing* des souris *mdx* est très fortement augmentée pendant les minutes qui suivent la contention.

Lors de la manipulation de souris *mdx* qui effectueront des tâches comportementales, la contention est à proscrire ou à limiter, même si c'est la technique recommandée dans les formations à l'expérimentation animale pour la manipulation des souris.

d. Mémoire et apprentissage

La souris *mdx* présente un phénotype normal dans des tests d'apprentissage distribués en piscine de Morris (Sesay *et al.*, 1996) ou dans une tâche de discrimination spatiale en labyrinthe radial (Vaillend *et al.*, 1998), mais des déficits sont observés dans un test de conditionnement opérant, dans une tâche de reconnaissance d'objet ou lors de la rétention à long terme d'un apprentissage massé en piscine de Morris (Vaillend *et al.*, 1995 ; 2004). Ces déficits pourraient s'expliquer par une mémoire plus fragile après un apprentissage partiel, avec pour conséquence des déficits spécifiques de la mémoire à long terme qui pourraient en partie dépendre d'un dysfonctionnement des processus de consolidation et/ou de rappel mettant en jeu l'hippocampe.

L'exacerbation des réponses de peur inconditionnée chez la *mdx* suggère que ce modèle pourrait aussi présenter des déficits dans des tâches aversives et des conditionnements de peur dépendants de l'amygdale, mais cette hypothèse n'était toujours pas clairement validée au début de ce travail de thèse. En effet, Sekiguchi *et al.* (2009) ont réalisé sur ces souris une tâche de conditionnement de peur associée au contexte (association entre un choc électrique et un contexte expérimental) révélant une réponse de *freezing* plus forte chez les *mdx* que les souris sauvages. Mais au contraire, Perronnet *et al.* (2012) trouvent un résultat inverse, allant encore une fois dans le sens d'un déficit de mémoire à long terme et des études plus anciennes avaient également montré un déficit de mémoire à long terme dans une tâche d'évitement passif (Muntoni *et al.* 1991).

e. Plasticité synaptique et inhibition GABAergique

Sbriccoli *et al.* (1995) et Carretta *et al.* (2003 ; 2004) montrent une réorganisation des neurones du cortex sensori-moteur chez la souris *mdx*, qui sont moitié moins nombreux, plus petits et de forme plus ronde que les neurones pyramidaux des souris contrôles. Del Tongo *et al.* (2009) montrent une augmentation sélective du nombre d'interneurones GABAergiques à parvalbumine dans la couche CA2 de l'hippocampe (45%) et dans le gyrus denté (25%). En revanche, il ne semble pas y avoir de modification de l'organisation des neurones pyramidaux excitateurs dans l'hippocampe des souris *mdx* (Miranda *et al.*, 2009), même si ces neurones sont plus sensibles à un stress hypoxique (Mehler *et al.*, 1992). Cette absence de réorganisation dans l'hippocampe a très récemment été nuancée par la même équipe (Miranda, *et al.*, 2016). Là où Sbriccoli *et al.* (1995) trouvent d'importantes réorganisations globales, dans l'hippocampe elles semblent plus localisées,

avec une diminution selon l'axe antéro-dorsal de la couche CA1 où les souris *mdx* présentent un déficit de densité neuronale pouvant atteindre 34%.

Au-delà de ces changements morphologiques, l'hypothèse actuelle expliquant les altérations cognitives s'oriente plutôt vers une altération de la fonction neuronale, portée par une malfonction synaptique associée à un déficit du complexe Dp427-DGC. Vaillend *et al.* (1998) mettent en évidence une augmentation de la plasticité synaptique (i.e., potentialisation à long terme, ou LTP) dans la couche CA1 de l'hippocampe des souris *mdx* et précisent plus tard que cette augmentation de la LTP peut perdurer pendant plusieurs heures (Vaillend *et al.*, 2004) et qu'elle est corrélée à des modifications ultrastructurales des synapses (Miranda *et al.*, 2009 ; 2011). La même année, Anderson *et al.* (2004) montrent une réduction de la dépression à long terme dans les cellules de Purkinje du cervelet associée à une augmentation de la dépression à long terme homosynaptique (Anderson *et al.*, 2010), suggérant des altérations de nature variable en fonction des circuits locaux étudiés au sein d'une même structure. Ces formes de plasticité ayant été associées aux processus de consolidation mnésique, on suppose actuellement un lien entre les déficits de mémoire et ces altérations de la plasticité synaptique chez la souris *mdx*.

L'hypothèse majeure est une altération de la neurotransmission inhibitrice, la dystrophine et le dystroglycane colocalisant normalement avec les récepteurs du GABA dans les synapses inhibitrices des neurones (Vaillend, *et al.*, 2010). Dans le système nerveux central, la perte de dystrophine et donc l'altération de son complexe associé conduit à une diminution de 40–70% des clusters de récepteurs GABA_A dans l'hippocampe (Knuesel *et al.*, 1999), le cervelet (Grady *et al.*, 2006) et l'amygdale (Sekiguchi *et al.*, 2009). Cependant, la dystrophine ne semble pas jouer un rôle direct dans l'ancrage membranaire des récepteurs du GABA (Brünig *et al.*, 2002; Lévi *et al.*, 2002), mais plutôt un rôle dans la stabilisation des clusters à l'aide des neurexines et des neuroligines, des protéines trans-synaptiques avec lesquelles la dystrophine interagit (Fritschy *et al.*, 2003; Craig et Kang, 2007).

D'autres études neurophysiologiques viennent conforter ce rôle potentiel de la dystrophine dans la modulation du système inhibiteur GABAergique. A la fois dans le cervelet et dans l'hippocampe, la capacité de la bicuculline (un antagoniste des récepteurs du GABA) à moduler la neurotransmission glutamatergique est réduite chez la souris *mdx* (Anderson *et al.*, 2003; Vaillend et Billard, 2002) et l'inhibition GABAergique phasique, médiée par les récepteurs synaptiques du GABA, l'est également (Fuenzalida *et al.*, 2016). L'étude de Kueh *et al.* (2011) suggère aussi une réduction du nombre des récepteurs GABAergiques à la synapse dans les cellules du Purkinje, tandis qu'une augmentation de la réponse tonique induite par le gaboxadol (agoniste des récepteurs extrasynaptiques du GABA), suggère une augmentation du nombre des récepteurs extrasynaptiques GABAergique. Il est possible que la perte de Dp427 réduise la stabilité des récepteurs synaptiques qui pourraient alors diffuser vers les zones extrasynaptiques, mais il est également possible

que la composition en sous-unités des récepteurs soit modifiée chez la souris *mdx* (Fritschy *et al.*, 2012).

De façon intéressante, l'altération GABAergique pourrait aussi impacter l'excitabilité neuronale induite par les récepteurs glutamatergiques AMPA/kainate (Yoshihara *et al.*, 2003 ; De Sarro *et al.*, 2004) et NMDA (Vaillend *et al.*, 1999), compromettant, de fait, la balance excitation/inhibition cérébrale avec un effet modulateur facilitant certaines formes de plasticité synaptique. Une ré-expression de dystrophine induite par thérapie génique chez la souris *mdx* permet de restaurer les clusters de récepteurs GABA_A et de normaliser la LTP dans l'hippocampe, ce qui est en faveur d'un rôle dynamique de la dystrophine dans ces mécanismes de plasticité du cerveau adulte (Vaillend *et al.*, 2010 ; Dallérac *et al.*, 2011).

Au-delà de la fonction GABAergique et glutamatergique, la perte de Dp427 est également associée à des altérations de la transmission nicotinique cholinergique dans l'hippocampe (Coccorello *et al.*, 2002 ; Wallis *et al.*, 2004 ; Ghedini *et al.*, 2012 ; Parames *et al.*, 2014 ; Cohen *et al.*, 2015). Ceci pourrait refléter une adaptation du circuit hippocampique aux altérations GABAergiques et glutamatergiques, ces trois circuits étant fortement en interaction (Albuquerque *et al.*, 2009).

La dystrophine complète ne semble donc pas seulement jouer un rôle de structure, comme dans le muscle, mais semble également être un acteur important de la dynamique des synapses centrales ainsi que de la neurotransmission GABAergique. Cette hypothèse d'une altération du système inhibiteur pourrait être à la base d'une partie des déficits physiologiques et cognitifs observés dans la DMD.

3. La souris Dp71-null : modèle du subphénotype de déficience intellectuelle ?

La souris Dp71-null a été créée par transgénèse en insérant le gène de la β -Galactosidase dans le premier exon unique de la Dp71 (Sarig *et al.*, 1999). A l'inverse de la souris *mdx*, très étudiée car elle est un bon modèle pour les essais de thérapie musculaire, la souris Dp71-null est beaucoup plus confidentielle, ne présentant pas de myopathie et n'ayant fait l'objet que de 12 études.

Elle n'est pas un modèle typique de DMD car la perte sélective de Dp71 n'a été vue que chez un seul patient (de Brouwer *et al.*, 2014), cette perte étant généralement cumulée à la perte des autres dystrophines. Cependant ce cas clinique est très intéressant puisque ce patient présente une déficience intellectuelle mais pas de symptômes de myopathie.

Bien que découverte dès 1989, l'étude de la protéine Dp71 n'est devenue incontournable que récemment, du fait de la mise en évidence de son rôle dans deux phénotypes non-musculaires majeurs: l'altération de la physiologie rétinienne et les atteintes cognitives. Actuellement, la grande majorité des études utilisant la souris Dp71-null s'intéressent à la question rétinienne.

a. Phénotype comportemental

En 2009, Daoud *et al.* ont effectué une première caractérisation comportementale de la souris Dp71-null. Ils relèvent des déficits spécifiques caractérisés par un comportement exploratoire amoindri, de légères altérations de rétention dans une tâche d'évitement passif et un important déficit d'apprentissage et de mémoire spatiale dans une tâche dépendant de l'hippocampe. Ils suggèrent que ces déficits d'exploration peuvent résulter en partie d'une réactivité émotionnelle altérée et/ou reposer sur une altération du comportement de recherche de la nouveauté, ces comportements étant modifiés si la neurotransmission glutamatergique est augmentée (Granger, *et al.*, 1993), ce qui est le cas pour la Dp71-null. Les déficits d'apprentissage et de mémoire suggèrent en revanche que l'hippocampe est dysfonctionnel, ce qui est plausible vu que la Dp71 y est fortement exprimée. Cependant, ils notent qu'en diminuant la difficulté de la tâche, les performances sont améliorées chez les Dp71-null qui peuvent alors atteindre des scores comparables aux contrôles, suggérant tout de même une certaine intégrité de cette structure. Ces altérations de l'apprentissage chez la souris Dp71-null étant plus importantes que chez la souris *mdx*, ils concluent leur étude en rappelant que cela soutient l'hypothèse actuelle que la Dp71 joue un rôle majeur dans la genèse des déficits cognitifs associés à la DMD. De plus, là où le modèle *mdx* présente de fortes altérations de la neurotransmission GABAergique, la souris Dp71-null présente quant à elle une forte altération de la neurotransmission glutamatergique et des altérations comportementales différentes, suggérant un rôle distinct de la Dp71 par rapport à la dystrophine complète. Cependant, dans les deux modèles la balance excitation/inhibition semble modifiée en faveur de l'excitation. Un diagnostic comorbide d'épilepsie est observé dans une petite sous-population de patients seulement, suggérant que cette hyperactivité neuronale associée à la DMD peut être en partie compensée ou n'est pas d'une ampleur suffisante pour induire systématiquement un état épileptique (Hendriksen *et al.*, 2015).

La caractérisation phénotypique de la souris Dp71-null est très incomplète à ce jour et fait en partie l'objet de mon travail de thèse.

b. Rôle fonctionnel de la Dp71 dans le système nerveux

Au-delà des découvertes réalisées à l'aide de cellules en culture ou sur du tissu sain, la souris Dp71-null a permis de clarifier le rôle fonctionnel de la Dp71 au niveau du système nerveux central, plus particulièrement dans la glie de Müller et de Bergmann.

En absence de Dp71, le rassemblement des canaux potassiques Kir4.1 et aqueux AQP4 à la membrane plasmique est délocalisé et/ou diminué (Daloz *et al.*, 2003). C'est lors d'un stress, comme un décollement de la rétine ou un choc osmotique que l'absence de Dp71 est remarquable : la régulation volumique des cellules de Müller est alors impossible et la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique augmente très fortement (Sene *et al.*, 2009). De plus, Benabdesselam *et al.* (2010) montrent le rôle essentiel de la Dp71 dans la régulation de l'osmolalité plasmatique, celle-ci étant plus faible chez la souris Dp71-null que chez les contrôles. Dans la rétine, la Dp71 joue également un rôle dans l'inflammation

et les lésions vasculaires, ainsi que dans la dégénération des capillaires. Cela pouvant être une des raisons de la perméabilité accrue de la barrière hémato-encéphalique dans ce modèle (Vacca *et al.*, 2014 ; 2016 ; El Mathari *et al.*, 2015).

Les études récentes ne font que confirmer le rôle astrocytaire de la Dp71. Giocanti-Auregan *et al.* (2016) montrent que dans la rétine, le nombre des astrocytes est plus faible et que leur morphologie est altérée chez les souris Dp71-null dès P6 (sixième jour postnatal) et que ces anomalies se maintiennent jusqu'à l'âge adulte.

Récemment, Vacca *et al.* (2016) ont montré par thérapie génique que la réexpression de la Dp71 dans la rétine des souris Dp71-null permettait de restaurer la barrière hémato-rétinienne et de normaliser la réabsorption des œdèmes rétiniens, confirmant ce rôle glial clef de la Dp71.

Tous ces résultats, obtenus *in vivo* chez la souris Dp71-null, mettent en lumière le rôle clef de la Dp71 dans le cerveau, pouvant être à la base des déficits cognitifs observés chez les patients qui présentent une mutation dans la région distale du gène *dmd*.

4. Conclusion

Considérée comme une protéine de structure nécessaire à la stabilité membranaire des muscles dans les années 80, la dystrophine est aujourd'hui vue comme un composant clef de l'échafaudage des protéines exprimées dans une variété de tissus, comme le cerveau où plusieurs formes de dystrophine sont impliquées dans le clustering de nombreux récepteurs membranaires et canaux ioniques et dans la modulation de l'intégration des signaux cellulaires et de la plasticité synaptique. Les deux dernières décennies de recherche sur la DMD ont permis des avancées majeures dans les découvertes de processus cellulaires nouveaux et essentiels, comme l'est le clustering des récepteurs du GABA à la synapse inhibitrice centrale par la Dp427 et l'organisation de la machinerie moléculaire impliquant l'homéostasie aqueuse et potassique à l'interface gliovasculaire par la Dp71. Malgré des progrès majeurs, le rôle spécifique de chaque forme de dystrophine dans la genèse des déficiences cognitives dans la DMD nécessite des études plus approfondies pour être pleinement mis en lumière. Le développement rapide d'outils moléculaires et pharmacologiques modernes permettant la modulation de l'expression des dystrophines apporte de nouveaux espoirs pour de futures thérapies qui seront capables de traiter à la fois les altérations musculaires et cérébrales associées à la DMD.

IV. Objectifs

Si les altérations génétiques responsables de la DMD sont aujourd'hui caractérisées avec précision, la variété des symptômes et altérations centrales résultant de différents profils de mutation n'est que partiellement comprise. Cette hétérogénéité phénotypique et clinique s'explique tout autant par la diversité des formes de dystrophines (6 formes de taille variable) pouvant être touchées de manière cumulative en fonction de la position des mutations, que par le profil d'expression distinct de chaque dystrophine cérébrale, le tout couplé à des partenaires d'interaction divers incluant des protéines de structures (comme l'actine), des protéines transmembranaires (canaux ioniques et aqueux, récepteurs synaptiques) et des protéines synaptiques (neurexines, PSD95). L'absence des dystrophines désorganise ainsi l'architecture cytosolique, membranaire et extramembranaire de différents types de cellules neurales (neurones, astrocytes), avec des répercussions très vastes sur la neurophysiologie et les fonctions cognitives.

Au niveau cérébral, trois formes principales de dystrophine sont cruciales dans la genèse de déficiences intellectuelles : la forme complète (Dp427) et les formes courtes (Dp140, Dp71). Les études récentes chez les patients ont permis de mieux caractériser leur phénotype, qui présente des troubles cognitifs précoces indépendant de la myopathie et non évolutifs au cours de la vie. Les dystrophines semblent jouer des rôles importants aux niveaux sensoriel, émotionnel, intellectuel, et neuropsychiatrique. Des études récentes des relations génotypes-phénotypes ont permis de mieux cerner le rôle de certaines dystrophines, en particulier la Dp427 jouant un rôle important dans les tâches de mémoire verbale de travail (empan mnésique) et d'attention, tandis que la Dp71 serait à la base de déficiences intellectuelles plus profondes et de troubles neuropsychiatriques (autisme, ADHD, TOC). Cependant, ces études sont encore incomplètes et il reste beaucoup de questions en suspens.

Dans ce travail, nous avons utilisé la souris *mdx*, déficiente spécifiquement pour la Dp427, et la souris Dp71-null, déficiente spécifiquement en Dp71, afin d'apporter des éléments de réponse précis au rôle de chacune de ces dystrophines à l'échelle moléculaire, cellulaire et comportementale.

Dans la première partie de ce manuscrit, je présente les résultats de deux études publiées centrées sur la souris *mdx*, où nous avons effectué une réévaluation de son phénotype, des aspects sensoriels et émotionnels aux fonctions cognitives et exécutives. Cette approche multidisciplinaire combine des techniques d'immunohistochimie pour préciser le profil d'expression de la Dp427, des techniques électrophysiologiques pour étudier l'intégration des stimuli externes par les organes sensoriels, et une vaste étude comportementale permettant de préciser l'impact phénotypique de la perte de Dp427. Ceci nous a permis de mettre en évidence le rôle crucial de la Dp427 dans les processus d'apprentissage et de mémorisation reposant sur l'hippocampe et l'amygdale. Nous montrons aussi au travers de ces expérimentations la place centrale qu'occupe la Dp427 dans les altérations du comportement émotionnel, moteur et cognitif et nos résultats suggèrent que celles-ci reposent sur une dysfonction du système GABAergique, ce qui

apporte des preuves solides quant à la validité du modèle murin *mdx* pour l'étude des processus centraux qui mettent en jeu la Dp427.

La seconde partie de ce manuscrit est centrée sur l'étude de la souris Dp71-null, dont nous avons effectué une caractérisation comportementale détaillée comme pour la souris *mdx*, du sensoriel aux fonctions cognitives de haut niveau, mettant en évidence une altération des processus de mémoire de travail et de flexibilité comportementale. En collaboration avec M. Amar, nous apportons également des preuves électrophysiologiques d'une altération de la neurotransmission glutamatergique et de la balance excitation/inhibition dans le cortex préfrontal impliqué dans les fonctions exécutives. J'expliquerai en quoi ces résultats concordent avec les études cliniques qui lient la mutation de la Dp71 à la déficience intellectuelle et aux troubles neuropsychiatriques. Bien que seul un patient présente une mutation affectant uniquement la Dp71, l'ensemble des dystrophines étant en général mutées de manière cumulative chez la plupart des patients, le modèle Dp71-null apporte des éléments intéressants pour mieux comprendre la complexité et les substrats neurobiologiques mis en jeu dans la genèse d'une déficience intellectuelle sévère dans la myopathie de Duchenne.

La dernière partie est centrée sur ma participation à une étude collaborative, où mes compétences en immunohistochimie ont permis de compléter une vaste étude mettant en évidence l'efficacité d'une nouvelle molécule de thérapie génique, capable de restaurer l'expression de la Dp427 à des niveaux encore jamais observés chez la souris *mdx*, réexpression ciblant tout autant les organes périphériques (muscle, cœur, diaphragme) que le système nerveux central, et permettant de compenser certains déficits comportementaux. Cette technique basée sur le saut d'exon ne serait applicable qu'à une sous-population de patients et les études toxicologiques sont en cours, mais les résultats obtenus sont très prometteurs et porteurs d'espoirs réalistes pour un traitement global de la DMD.

Je conclurai ce travail de thèse par une discussion générale, confrontant nos résultats obtenus chez la souris *mdx* et Dp71-null à ceux observés par les cliniciens chez les patients. Ce sera aussi l'occasion d'explicitier certains aspects moléculaires de ce syndrome aujourd'hui encore difficilement quantifiable chez l'Humain, mais également d'appuyer le rôle central que doivent jouer les modèles murins dans les études de thérapie, en particulier en ce qui concerne le déficit cognitif.

Chapitre I

Rôle de la dystrophine complète (Dp427)

I. Perception, apprentissage associatif et fonctions exécutives

1. Contexte de l'étude

La dystrophie musculaire de Duchenne est un syndrome neuromusculaire lié à une mutation dans le gène *dmd* du chromosome X qui conduit à la perte de la dystrophine, protéine du cytosquelette, normalement exprimée à la fois dans le cerveau et dans le muscle. Le phénotype des patients est très hétérogène, associant des altérations cognitives variables et non évolutives à une dégénération musculaire progressive. Cette variabilité s'explique par la complexité du gène *dmd*, qui code pour 6 dystrophines de taille variable possédant chacune plusieurs variants d'épissage. La perte de la forme la plus courte (Dp71) aggrave fortement le phénotype cognitif, cependant, de nombreuses études suggèrent que la perte de la dystrophine complète (Dp427) peut suffire pour induire des altérations cognitives. Les fondements de ces déficits pourraient résider dans son expression cérébrale, au niveau des synapses inhibitrices de l'hippocampe, du cervelet et des aires corticales. Ces régions sont connues pour jouer un rôle dans les processus du langage, de la lecture, de l'apprentissage visuospatial, de la mémoire à court et long terme, ou encore de la mémoire de travail, fonctions qui sont altérées chez les patients DMD.

2. Méthodologie

Dans ce travail, nous avons entrepris une vaste étude comportementale, chez la souris *mdx* déficiente en dystrophine Dp427. Pour les tests comportementaux, nous avons utilisé des souris âgées de 10 à 16 semaines, période où l'animal ne présente que peu de symptômes musculaires, afin de n'avoir qu'une faible incidence sur la locomotion dans les tâches comportementales. Des femelles hétérozygotes (*mdx/+*) sont accouplées avec des mâles *mdx* (*mdx/Y*) afin d'obtenir dans la même portée des mâles sauvages WT (+/Y) et des mâles *mdx* (*mdx/Y*), générant des groupes expérimentaux le plus homogène possible en terme de proximité génétique en dehors de la présence de la mutation.

Les méthodologies utilisées dans cette étude sont relativement classiques et basées sur des tests dont les bases anatomo-fonctionnelles sont connues. Nous avons tout d'abord vérifié l'intégrité de la perception et du filtrage sensoriel auditif, avant d'utiliser ces stimuli dans des tâches d'apprentissages associatifs. La vérification de l'audition des animaux, nécessaire au vu de la littérature, a été réalisée en collaboration avec l'équipe de J.-M. Edeline, spécialisée dans ce domaine. Puis, nous avons étudié la mémoire émotionnelle en variant les protocoles expérimentaux afin de discriminer l'implication des différentes structures cérébrales classiquement impliquées dans le « circuit de la peur ». Pour aborder les fonctions exécutives, nous avons étudié la mémoire de travail, particulièrement sa sensibilité aux interférences proactives dans des tâches d'apprentissages spatiaux où des informations nouvellement acquises doivent être mises à jour continuellement pour la réussite de la tâche. Nous avons également analysé la flexibilité comportementale dans

des protocoles impliquant l'adaptation des stratégies d'apprentissage en réponse à des changements de règle.

Les analyses immunohistochimiques ont été réalisées sur du tissu frais (non perfusé), afin de mieux discerner le marquage ponctiforme typique des clusters de dystrophines au niveau de la membrane postsynaptique des synapses inhibitrices, qui est sensible aux conditions de fixation des tissus.

3. Résultats

Nous avons premièrement confirmé la présence de la dystrophine dans toutes les aires corticales, l'hippocampe et l'amygdale. Particulièrement exprimée dans les neurones pyramidaux de la couche CA1-CA4, le marquage est plus diffus dans les zones corticales et dans l'amygdale, probablement du fait d'une dispersion plus importante des neurones corticaux par rapport aux couches denses des régions CA1-CA4 de l'hippocampe. Bien que d'anciennes études aient détecté la présence de dystrophines dans la cochlée (Dodson *et al.*, 1995), dans l'aire auditive primaire (dans notre article) et qu'une faible expression soit possible dans le tronc cérébral (Lidov *et al.*, 1993), l'absence de Dp427 chez la souris *mdx* ne semble pas impacter l'audition de l'animal, ni sa capacité à filtrer les informations auditives dans le test d'inhibition du réflexe de sursaut.

La sensibilité à la douleur induite par un choc électrique n'est pas altérée chez les souris *mdx* et elles montrent un phénotype identique aux souris WT dans un test d'évitement passif. En revanche, et c'est un résultat majeur de l'étude, la souris *mdx* présente un retard d'acquisition dans un conditionnement de peur dépendant de l'amygdale, basé sur l'association entre un stimulus auditif (*stimulus conditionnel*) prédictif de l'émission d'un choc électrique (*stimulus inconditionnel*). Nous avons également confirmé la présence d'un déficit de rétention mnésique à un délai de 24h dans cette tâche, et une légère altération des performances au cours de l'acquisition d'un apprentissage spatial en piscine. Par contre les souris *mdx* n'ont pas présenté de déficit de performance lors d'un changement de règle dans des tâches impliquant la mémoire de référence spatiale en piscine ou dans un labyrinthe radial.

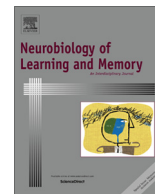
4. Conclusion

Les déficits de mémoire à long terme de la souris *mdx* dans divers tests suggèrent que la perte de la dystrophine complète (Dp427), altération commune à l'ensemble des patients DMD, est à l'origine d'altérations des processus d'acquisition et/ou de consolidation mnésique. Les altérations que nous avons mises en évidence, d'acquisition et de rétention à long terme dans des tâches de peur conditionnée, suggèrent que les bases neuroanatomiques de ces altérations reposeraient sur un circuit impliquant l'amygdale et l'hippocampe. Par contre, l'absence de dystrophine ne modifie pas la perception et le filtrage de stimuli sensoriels, ni la mémoire de travail spatiale ou la flexibilité comportementale. La dystrophine semble ainsi jouer un rôle principalement dans les processus d'acquisition et de rappel d'apprentissages, en accord avec la littérature récente qui montre que les variants mononucléotidiques de la dystrophine ont un impact sur la

cognition dans une population humaine saine. Par contre, l'hypothèse d'un rôle de la Dp427 dans les fonctions exécutives n'est pas validée dans ce modèle murin, et les altérations spécifiques de ces processus cérébraux pourraient dépendre de mutations affectant d'autres formes de dystrophines.

Article n°1

**Cognitive dysfunction in
the dystrophin-deficient
mouse model of
Duchenne muscular
dystrophy: A reappraisal
from sensory to executive
processes**



Cognitive dysfunction in the dystrophin-deficient mouse model of Duchenne muscular dystrophy: A reappraisal from sensory to executive processes



Rémi Chaussonot, Jean-Marc Edeline, Benoit Le Bec¹, Nicole El Massioui, Serge Laroche, Cyrille Vaillend*

Paris-Saclay Neuroscience Institute, UMR 9197, CNRS, F-91405 Orsay, France
 Univ. Paris-Sud, UMR 9197, F-91405 Orsay, France
 Université Paris-Saclay, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 April 2015
 Revised 9 July 2015
 Accepted 10 July 2015
 Available online 17 July 2015

Keywords:

mdx mouse
 Associative learning
 Executive functions
 Working memory
 Spatial learning
 Hearing

ABSTRACT

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is associated with language disabilities and deficits in learning and memory, leading to intellectual disability in a patient subpopulation. Recent studies suggest the presence of broader deficits affecting information processing, short-term memory and executive functions. While the absence of the full-length dystrophin (Dp427) is a common feature in all patients, variable mutation profiles may additionally alter distinct dystrophin-gene products encoded by separate promoters. However, the nature of the cognitive dysfunctions specifically associated with the loss of distinct brain dystrophins is unclear. Here we show that the loss of the full-length brain dystrophin in *mdx* mice does not modify the perception and sensorimotor gating of auditory inputs, as assessed using auditory brain-stem recordings and prepulse inhibition of startle reflex. In contrast, both acquisition and long-term retention of cued and trace fear memories were impaired in *mdx* mice, suggesting alteration in a functional circuit including the amygdala. Spatial learning in the water maze revealed reduced path efficiency, suggesting qualitative alteration in *mdx* mice learning strategy. However, spatial working memory performance and cognitive flexibility challenged in various behavioral paradigms in water and radial-arm mazes were unimpaired. The full-length brain dystrophin therefore appears to play a role during acquisition of associative learning as well as in general processes involved in memory consolidation, but no overt involvement in working memory and/or executive functions could be demonstrated in spatial learning tasks.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a common X-linked neuromuscular disorder caused by mutations in the *dmd* gene that prevent expression of dystrophin (Dp427, dystrophin protein of 427 kDa), a cytoskeletal protein normally expressed in both muscles and brain. This syndrome is associated with non-progressive cognitive and behavioral disabilities leading to compromised academic achievements and intellectual disabilities (ID) in a patient subpopulation. The etiology of the central defects is complex due to the variable location of mutations within the *dmd* gene, which may affect several shorter C-terminal brain dystrophins normally

produced from independent promoters (reviewed in Perronnet & Vaillend, 2010; Waite, Tinsley, Locke, & Blake, 2009). While genotype–phenotype studies unveiled that the severity of ID increases with the cumulative loss of different dystrophins (Desguerre et al., 2009), studies of heterogeneous cohorts of patients failed to characterize the precise nature of the cognitive dysfunctions specifically associated with the loss of distinct *dmd*-gene products.

Beyond global measures of the intelligence quotient (IQ), cognitive functioning in DMD includes deficits in language abilities, in reading and visuospatial learning and in both short- and long-term memories (Snow, Anderson, & Jakobson, 2013 for a review; Piccini et al., 2014). Impairments in working or short-term memory and limited verbal/auditory span have been highlighted as cardinal features of the neurocognitive profile in DMD, even in individuals with an IQ within the normal range, suggesting a link with the full-length brain dystrophin commonly lost in all patients (Hinton, De Vivo, Nereo, Goldstein, & Stern, 2000; Hinton, De Vivo, Nereo, Goldstein, & Stern, 2001). Recent studies,

* Corresponding author at: Paris-Saclay Neuroscience Institute, UMR 9197, CNRS, F-91405 Orsay, France. Fax: +33 1 69 15 77 26.

E-mail address: cyrille.vaillend@u-psud.fr (C. Vaillend).

¹ Present address: Unité Neurosciences, Information et Complexité (UNIC), CNRS UPR 3293, F-91190 Gif-sur-Yvette, France.

however, suggest the presence of a broader deficit in higher-order cognitive processing capabilities, specifically in executive function, which might constitute a core endophenotype leading to cognitive deficits in DMD (Donders & Taneja, 2009; Mento, Tarantino, & Bisiacchi, 2011; Wicksell, Kihlgren, Melin, & Eg-Olofsson, 2004). Executive functions refer to a set of control processes that optimize performance in cognitive tasks, mediate adapted and flexible behaviors and contribute to the temporal encoding and effortful processing in working memory required for response selection. Deficits in both memory processes and executive functions are likely related to the absence of brain dystrophin in central synapses of hippocampus, cerebellum and cortical areas including prefrontal cortex regions (Lidov, Byers, & Kunkel, 1993). Putative sensory processing disorders have also been suggested but largely overlooked (Poysky & Behavior in DMD Study Group, 2007), yet they might contribute to deficits in information processing and would be in line with the expression of dystrophin in sensory organs (Dodson, Piper, Clarke, Quinlivan, & Dickson, 1995; Wersinger et al., 2011). Previous behavioral studies in the dystrophin-deficient *mdx* mouse revealed deficits in diverse forms of long-term memory, associated with altered synapse plasticity and morphology (Miranda et al., 2009; Vaillend, Billard, & Laroche, 2004; Vaillend, Rendon, Mislin, & Ungerer, 1995). However, the possibility that brain dystrophin might play a broader role in perception and information processing and/or in executive functions has not been thoroughly investigated.

In the present study, we underwent a large-scale behavioral study in *mdx* and littermate control mice to first explore perception and gating of auditory stimuli, and the capacity to integrate relevant auditory stimuli during acquisition of associative learning. We then investigated working memory and its sensitivity to proactive interference, using both win-stay and win-shift paradigms in spatial learning tasks in which newly acquired information needs to be updated on a moment-to-moment basis to guide adapted behavior. To further address distinct properties of executive functions, we also analyzed cognitive flexibility in spatial tasks involving adaptation of behavioral strategies and performance during reversal learning.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Mice of the C57BL/10ScSn-*Dmd*^{mdx/J} (*mdx*) mutant and C57BL/10ScSnOlaHsd wild-type control strains were purchased from Charles River Laboratories (Saint-Germain sur l'Arbresle, France) and Harlan Laboratories (U.K.), respectively. As the *mdx* mutation is recessive and located in the *dmd* gene on the X chromosome, heterozygous females (*mdx*+) were mated with wild-type inbred males (+/Y) to produce male mutant (*mdx*/Y) and wild-type littermate mice (+/Y). The genotype was determined by PCR as described (Perronnet et al., 2012). Male siblings were kept in the same cage (two to five mice per cage) under a 12-h light–dark cycle (light on: 7.00 a.m.) with food and water *ad libitum*. Independent groups of 10–16 weeks male siblings were used for each test. Test mice were placed in individual caging at least 8 days before testing. All experiments were conducted blind to the genotype and in accordance with the guidelines established by the European Communities Council Directive (2010/63/EU Council Directive Decree). The protocol was approved by the ethical committee Paris-Sud and Centre (CEEA N°59).

2.2. Immunofluorescence

Brains dissected out following cervical dislocation were fresh-frozen in powdered dry-ice and stored at -80°C . Brains

sections (30 μm thick) were cut at -12°C on a cryostat and collected on Superfrost+ glass slides (Roth, France). For immunofluorescence analysis, the slides were first thawed for 1 min at RT, immersed in an acetone/methanol fixative solution (1:1) for 5 min at -20°C and washed 3 times in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS). Slides were then incubated first in a blocking solution for 45 min (10% normal goat serum, 0.3% Triton X-100, 1% bovine serum albumin), then overnight at 4°C in the 5G5 primary monoclonal antibody directed against the N-terminus of full-length dystrophin (dilution: neat; gift from D. Mornet, Montpellier), then washed and incubated with secondary antibody conjugated to Cy3 (Jackson Immunoresearch, USA) diluted 1:400 in PBS 0.1 M with 5% NGS and 1% BSA for 1 h at RT. No specific dystrophin staining was observed in sections processed from *mdx* mice and in control sections from WT mice when prepared by omitting the primary antibody. Images were collected using a laser scanning confocal microscope LSM 700 (Zeiss) at 555 nm. Stacks of 13 images (320 \times 320 μm) spaced by 500 nm were imported using an EC Plan-Neofluar 40 \times /1.30 Oil M27 at a resolution of 310 nm/pixel. Stacks were processed with the ImageJ imaging system (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) using a maximum intensity projection of all the z-stack images. Brain regions expressing dystrophin were identified using the mouse brain Atlas (Paxinos & Franklin, 2001).

2.3. Sensory processes

2.3.1. Auditory brainstem responses

The auditory brainstem responses (ABRs) were recorded in response to acoustic stimuli under deep anesthesia (95 mg/kg ketamine, 24 mg/kg xylazine, I.P.). Mice were placed on a heating blanket to avoid hypothermia. Auditory stimuli were presented monaurally using an insert earphone (Etymotic Research ER-1, USA) ending with a 17 mm polyethylene tubing inserted into external auditory meatus to avoid sound reverberation on ear lobe. ABRs were recorded using two subcutaneous electrodes (SC25, Neuro-Services, France) located just above the tympanic bulla and skull dorsal midline and one ground electrode placed in the thigh. Insertion of subcutaneous electrodes was not associated with any sign of discomfort. ABRs were collected by a Centor-USB interface (DeltaMed, France). A session lasted 40–50 min. Each session started with click presentations (100 μs) which contained a broad range of frequencies (2–32 kHz). This was followed by pure tone bursts (duration: 10 ms; rise-fall time: 2 ms) delivered at specific frequencies (8, 2, 16, 24, 4, and 32 kHz) and the session ended with click presentations to control that the experiment did not induce acoustic trauma. Click and pure tone bursts were presented at 70, 50, 40, 30, 20, 10, 5 and at 0 dB SPL (decibel in sound pressure level), to quantify the ABR wave amplitudes across decreasing stimulus intensities. Stimuli were presented at 15 Hz, which enabled recording of stable peak latencies. An artifact rejection procedure was used to avoid respiratory and cardiac interferences (response amplitudes $> 40 \mu\text{V}$). The signal was filtered at 0.2–3.2 kHz with a sampling rate of 100 kHz and waveforms were averaged (500–1000 waveforms depending on the stimulus intensity) and stored for off-line analyses. ABR latency was taken at the positive amplitude peak of the waveform (Fig. 2B). Amplitude was calculated as the difference between the positive and negative peaks of the waveform (I to I' and III to III', Fig. 2B). All sound intensities are expressed in dB SPL.

2.3.2. Auditory gating

The acoustic startle reflex (ASR) was induced by a high intensity tone (pulse) and its amplitude was modulated by presentation of non-startling low-intensity prepulses to evaluate auditory gating.

Apparatus – Testing was conducted in a conditioning chamber (19 \times 25 \times 19 cm) placed on an anti-vibration table inside a dark

ventilated sound-attenuating chamber (67 × 53 × 55 cm, StartFear System, Panlab, Spain). The chamber was composed of black methacrylate walls, a transparent front door, a speaker placed at the center of the roof and a grid floor. Mice were placed in a small non-restraining plexiglas cylinder (5 × 10 × 3.5 cm) mounted on the grid floor 5 min prior to testing (acclimation period) and throughout the experiment. Apparatus was cleaned with 100% ethanol between each test. The Startle Software (StartFear System, Panlab) controlled an audio generator to deliver a background white noise (BWN, 65 dB, present throughout testing), startling pulses (55 dB above BWN, 10 kHz, 40 ms), and non-startling prepulses (0–12 dB above BWN, 10 kHz, 20 ms).

Procedure – Each trial consisted in the delivery of either one stimulus (pulse) or one pair of stimuli (prepulse/pulse) with inter-trial intervals (ITIs) of 10, 15 or 20 s distributed in a pseudo-random order. Startle responses were detected and transduced by a piezoelectric accelerometer plugged on the grid floor; the Startle Software exported the maximum startle amplitude and its latency. All mice were submitted to two sessions (one per day), each starting by delivery of 3 startling pulses, to ensure reliable recording of startle reflex, and ending by delivery of 3 other startling pulses to assess stability of the startle reflex.

On the first session, the capacity of a prepulse to reduce the amplitude of the startle reflex (prepulse inhibition of ASR, or PPI) was evaluated by exposing mice to 6 blocks of 5 pairs of stimuli each composed of one prepulse (0, 3, 6, 9 or 12 dB above BWN) delivered 100 ms before a startling pulse of 120 dB (55 dB above BWN). Distinct prepulse intensities were presented in a pseudo-random order within each block and counterbalanced between blocks. On the second session performed 3 days later, the magnitude of PPI was modulated by introducing prepulse/pulse intervals of different durations (100, 300 and 1000 ms) within 9 blocks of 4 pairs of stimuli composed of one prepulse (0 or 12 dB above BWN) followed by a startling pulse of 120 dB. In both experiments, individual amplitudes and latencies recorded in distinct blocks of trials were averaged. PPI was normalized to the startle amplitude induced by the 120 dB startling pulses that were preceded by a 0 dB prepulse and delivered within blocks, using the following formula: %PPI = (startle amplitude induced by a pulse preceded by a prepulse)/(startle amplitude induced by 120 dB pulse alone) × 100.

2.4. Fear conditioning

The capacity to associate a tone (conditioned stimulus, CS) with an incoming scrambled electric footshock (unconditioned stimulus, US) was assessed in distinct paradigms to analyze the modulation of performance by extinction and distraction procedures.

Apparatus – All experiments were conducted in the same apparatus as for the startle and PPI experiments. However, a different chamber context was used for retention and extinction sessions (new context) in order to selectively analyze cued, but not contextual fear conditioning. In this new context, the chamber was of the same size but was composed of white metal walls and flat floor. There was no light inside the test chamber. The Freezing Software (StartFear System, Panlab) was used to control the delivery of CS and US and to apply continuous background white noise throughout the testing periods (60 dB). Mouse activity was detected and transduced by a piezoelectric accelerometer plugged on the grid floor. Complete immobilization of the mouse, except for respiration, was regarded as a freezing response. The Freezing Software (Panlab) enabled automatic analysis of the freezing behavior, which was previously shown in our laboratory to be highly correlated with measurements made manually or with videotracking systems. The apparatus was cleaned with 100% ethanol between each animal.

2.4.1. Footshock threshold test

Mice were individually placed at the center of the conditioning box and allowed for a 2-min habituation period, after which electric footshocks (duration: 2 s) of gradually increasing intensities (from 0.05 mA; increment: 0.05 mA) were administered every 20 s. The intensities required to elicit flinching, jumping and vocalizing behaviors were recorded.

2.4.2. Delay cued fear conditioning

Following a 2-min habituation period allowing free exploration of the test chamber, mice were presented with 5 CS–US pairs delivered at variable intervals of 60–180 s distributed in a pseudo-random order (acquisition). In a separate experiment with distinct groups of mice, the acquisition session was repeated in the same condition 24 h after the end of the first session, to increase the strength of conditioning. In both sessions, the US (0.4 mA, 2 s) was delivered immediately after the end of the tone (80 dB, 10 kHz, 30 s). During the next two days (retention 1 and 2), mice were placed in a new chamber context and presented with 16 CS alone (no electrical footshock) at intervals of 60–150 s distributed in a pseudo-random order.

2.4.3. Trace fear conditioning

On the first day mice were allowed to freely explore the conditioning chamber for 5 min. On the second day the acquisition phase started with a 3-min free exploration period, followed by delivery of 6 CS–US pairs separated by intervals of 120, 180 or 240 s. In each pair, the footshock (US) was delivered 30 s (trace) after the end of the tone (80 dB, 10 kHz, 15 s). On the third day (retention session), the mice were placed in a new context and presented with three CS delivered alone (no electrical shock) with a 60 s interval between CS. Three hours later, mice were placed back in the initial acquisition context for 5 min to evaluate contextual fear memory.

2.4.4. Inhibitory avoidance learning

The apparatus was in white plexiglas with 20 cm-high walls. It consisted of a brightly lit compartment as the shock-free zone (40 × 15 cm; illumination: 600 lx) connected by a trap door (6 × 6 cm) to a dark compartment (15 × 15 cm; illumination < 10 lx) with an electrified grid floor. The acquisition session consisted of a single trial during which the mouse was placed in the center of the shock-free zone for 30 s before opening the trap door. The latency to enter the electrified zone was recorded; the trap door was closed as the mouse stepped into the dark compartment and a footshock was delivered after 5 s (0.4 mA, 2 s); the mouse was allowed a 15 s recovery period in the dark compartment before returning to its home cage. Retention testing in separate groups of mice (both genotypes) took place 24 h, 72 h and 1 week post-training. No footshock was delivered during the retention sessions and the latency to step into the dark compartment (600 s ceiling) was taken as a measure of retention.

2.5. Spatial learning

2.5.1. Reversal learning and working memory in the radial maze

Apparatus – The automated radial maze (Ugo Basile, Italia) had a central platform (16 cm in diameter) and eight arms (5.5 × 35 cm) customized with low-profile walls (height: 1 cm; initial step from door: 8 × 7 cm length) to avoid falls and to optimize the visibility of extra-maze cues for allocentric spatial orientation. The maze was placed on an 80 cm-high table in the center of a room containing several distal visual cues (door, desk, two halogen lamps, flat drawing and relief sculpture on the wall) that were not placed in front of any specific arm to avoid simple guidance strategies. A guillotine-like mechanism operated from a manual control unit

enabled to quickly but silently open and close individual sliding doors at the entrance of each arm.

General procedure – Mice were changed to individual caging 12 days before testing. After 8 days of habituation to their new housing conditions, the mice were handled twice daily and a water restriction regimen started after 2 days. Each day, mice were then allowed to drink 0.2 ml of a 0.1% saccharine solution, to get familiarized with the reward used for training, and 1 ml of water. Mice were weighted daily and maintained at 85–90% of their initial weight. Testing started with two days of free exploration of the maze with all doors opened, during which mice could retrieve 3 (on the first day) to 1 (the second day) drops of the saccharine solution in each arm (15 μ l solution per drop). Mice were given 1 ml drinking water after testing. The following days consisted in successive training sessions in one of the two paradigms described below.

Reversal learning – Mice were first submitted to a win-stay paradigm composed of a 10-day acquisition phase, during which mice were trained to retrieve one reward placed in a small cup at the end of one single baited arm, in 6 consecutive trials per day. Each trial started by placing mice on the central platform for 15 s before the opening of all doors. The baited arm remained the same throughout the initial discrimination task for a given mouse. On day 11, the reward was moved to a new baited arm located 135° anticlockwise from the previously baited arm and the mice were allowed to learn the new rewarded position for 5 days (6 trials per day). Throughout learning, each trial was completed when the mouse reached the end of the baited arm and returned to the central platform after consuming the reinforcement, or after a maximum duration of 300 s. Mice were then returned to their home cage for 60 s before the start of the next trial. Reference memory errors were defined as first visits into non-baited arms and working memory errors as re-visits of non-baited arms within the same trial. The latency of the first visit and trial duration were also recorded.

Spatial working memory – The acquisition phase lasted 7 days and consisted of 2 trials per day (see Fig. 4E). Each trial started by placing the mouse on the central platform before door opening. For the presentation phase, only 3 doors were opened to provide access to only three baited arms. Mice were then maintained on the central platform for 15 s. During the choice phase, six doors were simultaneously opened, giving access to the three previously baited arms and to three novel arms. Only the 3 novel arms were baited during the choice phase. Distinct sets of arms were used across trials. On day 8, working memory performance was challenged by increasing the delay between the presentation and choice phases to 30 s instead of 15 s. On day 9, a marble was placed in the first third of each arm as a distracting object that could be explored by mice on their way to retrieve the rewards. The marbles were fixed close to the profile walls and did not obstruct the way to the reward.

2.5.2. Navigation and reversal learning in the water maze

Apparatus – The maze was a circular tank (150 cm in diameter) filled with water (21–22 °C) to 7 cm below the top of the sidewall, made opaque by addition of a white non-toxic paint (Opacifier 631, Morton SA, France). A circular escape platform (11 cm in diameter) was placed in the center of the maze during pre-training or in the center of a quadrant (40 cm from the wall) during training. The platform placed 0.5 cm below the water surface was not visible. The maze was placed in a well-lit room (380 lx) containing several extra-maze cues. A video camera mounted on the ceiling was connected to a computer located in an adjacent room and the data were recorded and analyzed using the Any-Maze Video Tracking System (Stoelting, USA).

Procedure – One day before training, the mice underwent four trials during which they were trained to find and stay on the escape platform for 60 s (pre-training). Then, the training phase lasted 14 days and consisted of 4 successive trials during which the platform was always located in the same quadrant for a given mouse. Mice were introduced into the water maze from three different starting points in the quadrants that did not contain the platform and was allowed to swim freely until it reached the platform. Mice failing to find the platform after 90 s were gently guided to it by hand and a maximum escape latency of 90 s was recorded. Mice remained 60 s on the platform before the start of the next trial. After the training phase, the platform was moved in the opposite quadrant and mice were given 6 additional days of training to learn the new platform position (reversal). Individual swim paths were recorded with the ANY-maze software and the following parameters were analyzed: the swim speed, the distance swum, and the time spent in various virtual areas of the maze: the four quadrants, the four platform annuli representing the putative platform positions, four extended annuli (48 cm in diameter) surrounding platform positions, and a virtual corridor (19 cm in width) set along the wall to quantify thigmotaxis. Path efficiency was defined as an index of the efficiency of the path taken by the animal to get from its start position to the platform, with a score of 1 indicating perfect efficiency (straight line trajectory).

3. Results

3.1. Expression of brain dystrophin

In WT mice, dense dystrophin immunoreactivity (IR) was observed in neurons of all cortical areas, hippocampus and amygdala (Fig. 1). Dystrophin IR was characterized by punctate staining along the plasma membrane of neuronal bodies and in the dendritic fields, reflecting specific dystrophin expression in central inhibitory synapses (Knuesel et al., 1999). As expected, hippocampal dystrophin IR was restricted to the pyramidal neurons of the CA1–CA4 subfields and was particularly intense within stratum pyramidale, stratum oriens and proximal dendritic layer of stratum radiatum. In both cortical and amygdala areas, punctate IR was more scattered, likely due to reduced neuronal packing in these regions compared to hippocampus. In *mdx* mice no specific punctate dystrophin immunoreactivity was observed (see Fig. 1, right panels only shows unspecific staining of blood vessels also observed when the primary antibody was omitted), indicating that dystrophin was lost in both hippocampo-cortical and amygdalo-cortical functional networks.

3.2. Hearing and sensory gating of auditory stimuli

Previous studies of auditory perception in *mdx* mice led to conflicting results, showing either hearing loss when tested with clicks containing a broad range of frequencies (2–32 kHz) (Raynor & Mulroy, 1997) or normal hearing when tested with pure frequency sounds (Pillers et al., 1999a). Here, we increased the number of averages and stimulus rate (15/s) to eliminate non-specific signals from respiratory and cardiac activity in baseline recordings and we applied decreasing ramps of auditory stimulus intensities to undertake a fine analysis of auditory brainstem responses (Gourévitch, Doisy, Avillac, & Edeline, 2009). This allowed us to obtain better accuracy of hearing thresholds recorded in response to clicks (2–4 dB instead of 20–40 dB) and to generate highly discriminant audiograms for pure tone frequencies (Chabout, Cressant, Hu, Edeline, & Granon, 2013; Willott, 2006). The ABR thresholds (expressed in dB SPL) at presentation of clicks and pure

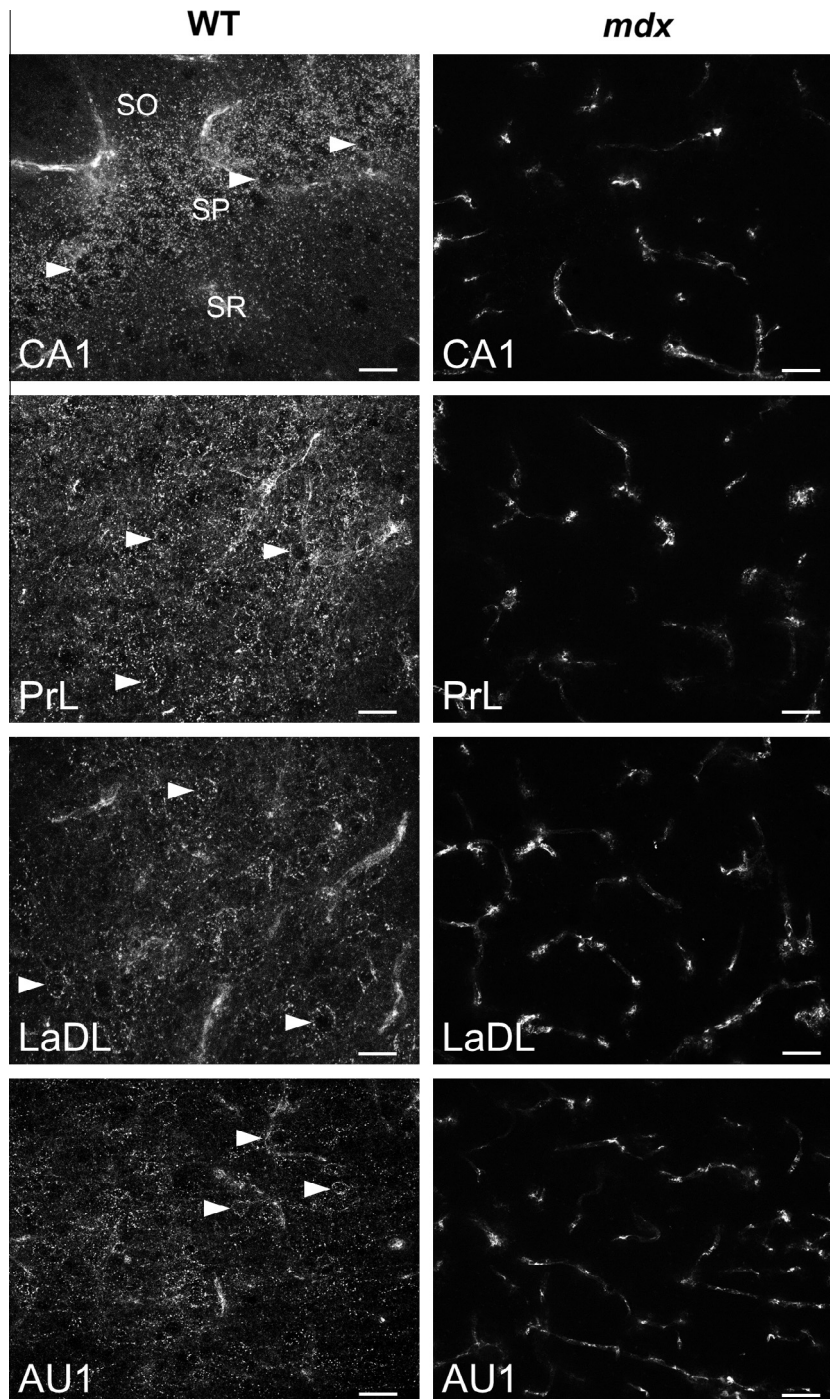


Fig. 1. Dystrophin immunoreactivity. Sample images show punctate immunofluorescent staining detected in WT mice (left) and lack of specific dystrophin immunoreactivity in *mdx* mice (right) in hippocampal CA1 (CA1), prelimbic cortex (PrL), dorsolateral part of lateral amygdaloid nucleus (LaDL) and primary auditory cortex (AU1), as indicated. Fluorescent staining of some blood vessels in *mdx* mice was also observed when the primary antibody was omitted and is therefore attributed to unspecific binding of the anti-mouse secondary antibody. Each image reflects the maximum intensity projection of stacks of thirteen images spaced by 500 nm. Arrow heads point to sample cell bodies. SO: stratum oriens; SP: stratum pyramidale; SR: stratum radiatum. Scale bar: 20 μ m.

tones are displayed in Fig. 2A. ABRs thresholds were comparable between genotypes in response to the click delivered at start ($p > 0.6$) and end of the experimental session ($p > 0.7$). The start and end threshold were comparable, indicating that the protocol did not induce any hearing loss in any genotype ($p > 0.6$). ABRs threshold in response to pure tones exhibited a typical V-shape curve (frequency effect: $p < 0.001$) with an optimal threshold detected at 8 kHz. No difference was found between genotypes

(genotype: $p > 0.9$; genotype \times frequency effects: $p > 0.7$). We further undertook a detailed analysis of the four waves composing the ABR triggered by the clicks and the 8 kHz tones at variable intensities (see a sample trace in Fig. 2B). Fig. 2C and D shows the latencies and amplitudes of waves I and III recorded at 70 dB, which reflect the response of the auditory nerve fibers and the superior olivary complex, respectively. Both latencies and amplitudes were comparable between genotypes for these two waves,

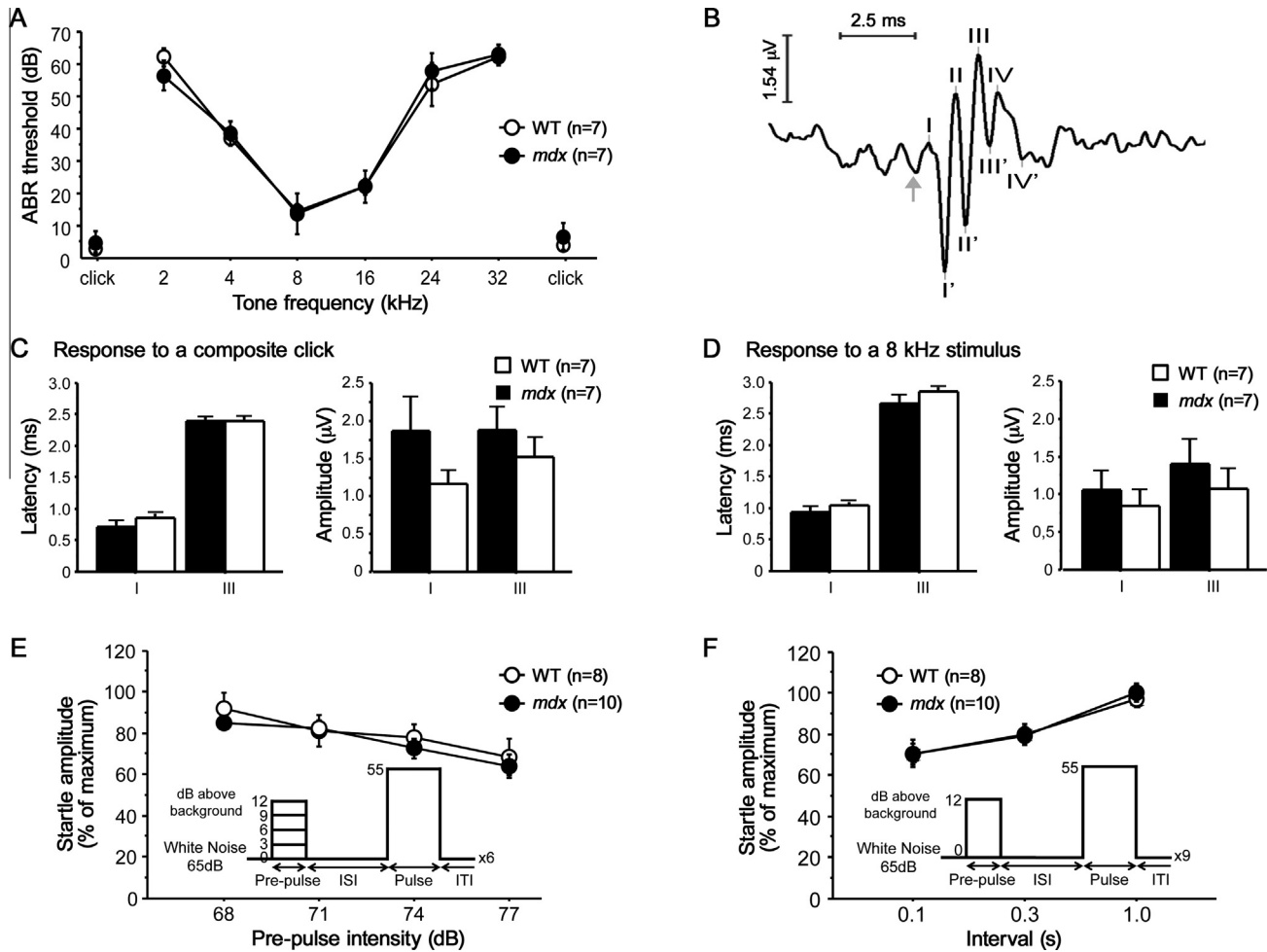


Fig. 2. Auditory brainstem responses (ABR) recorded in WT and *mdx* mice. (A) ABR thresholds for clicks and pure tone frequencies demonstrate normal hearing in *mdx* mice. (B) Sample ABR to a click at 70 dB, showing the successive waves labeled I to IV (positive peaks) and I' to IV' (negative peaks). Wave I arises from the auditory nerve and waves II to IV reflect evoked activity at different relays of the auditory brainstem. Gray arrow: click presentation. (C) Latencies and amplitudes of waves I and III following click presentations. (D) Latencies and amplitudes of waves I and III following stimulation at 8 kHz. (E) Prepulse inhibition of the acoustic startle reflex (PPI), expressed as the amplitude of the startle response when the startling pulse was preceded by a prepulse of 3, 6, 9 or 12 dB above background noise. Data are normalized to the maximal amplitude recorded in the absence of prepulse. (F) Normalized startle response amplitude when the prepulse (12 dB above background) was presented 0.1, 0.3 or 1 s before the startling pulse.

as well as for the other ABR waves (not shown). No genotype difference was found when these waves were analyzed at different stimulus intensities.

Following this demonstration of normal hearing in *mdx* mice, we further determined their capacity to efficiently integrate and gate auditory stimuli using a paradigm based on inhibition of the startle reflex. We first confirmed that delivery of 120 dB pulses elicited startle responses of comparable amplitudes in the two genotypes ($p > 0.2$), reflecting unimpaired startle reflex in *mdx* mice. As shown in Fig. 2E, the addition of a non-startling prepulse (3–12 dB above the 65 dB background noise) delivered 100 ms before the 120 dB startling pulse induced a progressive decrease in startle amplitude as a function of prepulse intensity ($p < 0.001$), reflecting prepulse-induced inhibition of the startle response (PPI). The percent decrease in the startle response was comparable between genotypes for all prepulse intensities ($p > 0.5$). As shown in Fig. 2F, increasing the delay between the prepulse and the startling pulse from 0.1 to 0.3 or 1 s induced a delay-dependent increase in startle amplitude, i.e., a decrease in PPI ($p < 0.001$). The startle amplitude recorded in response to the prepulse delivered 1 s before the startling pulse was not significantly different from the amplitude recorded in the absence of prepulse ($p > 0.9$; one sample

sign test). The delay-dependent changes in PPI were comparable between genotypes (genotype effect: $p > 0.7$; genotype \times delay interaction: $p > 0.9$). Hence, auditory sensory gating was not altered in *mdx* mice.

3.3. Associative learning and fear memories

We first used the footshock threshold test as a control experiment for shock sensing in the two genotypes (Fig. 3A). This clearly showed that footshock threshold intensities required to elicit flinching, jumping and vocalizing responses were statistically comparable between genotypes ($p > 0.3$). Flinching was the first type of behavioral response displayed for low intensities (< 0.1 mA), which is below the intensities used during conditioning experiments (0.4 mA).

During inhibitory avoidance testing, mice could rapidly learn to escape from footshock delivery by avoiding entries into the dark compartment of the apparatus. During acquisition, the latency to enter the dark compartment was statistically comparable in the two genotypes ($p > 0.3$; not shown) and both *mdx* and WT mice therefore received a footshock in this compartment within the first minute after introduction into the apparatus. During retention

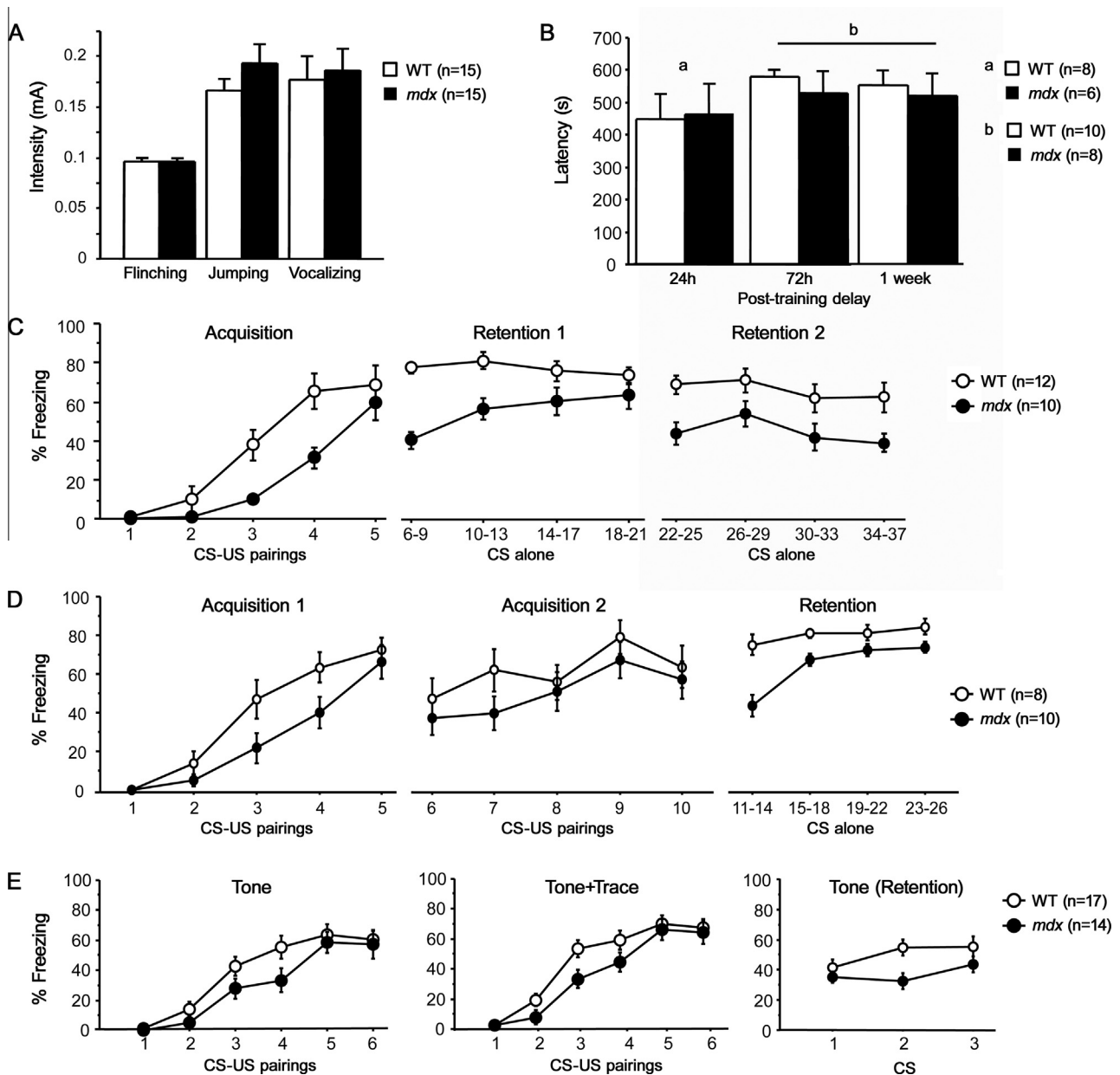


Fig. 3. Associative learning and fear memory in WT and *mdx* mice. (A) Threshold of footshock sensing expressed by the intensity (mA) at which a single 2-s footshock elicited flinching, jumping and vocalizing behaviors. (B) Inhibitory avoidance expressed by the latency to enter the dark compartment during retention tests performed 24 h, 72 h and 1 week post-training. (C) Delay cued fear conditioning. Performance is expressed as the percent time spent freezing to the CS during the acquisition session and the two retention sessions performed at 24 h intervals. (D) Delay cued fear conditioning with two sessions of acquisition. Performance is expressed by the percent time spent freezing to the CS during acquisition and retention sessions. (E) Trace Fear conditioning. Performance during acquisition is expressed by the percent time spent freezing during presentation of the CS (left panel) and during a period including CS presentation and trace (middle panel). Retention performance is expressed by the percent time spent freezing to CS.

sessions performed at distinct post-training intervals (24 h, 72 h, 1 week) (Fig. 3B), the latencies to enter the dark compartment were largely increased regardless of the genotype (>6 min) and there was no significant genotype effect (all intervals, $p > 0.4$). Increasing illumination in the lit box (from 600 to 2000 lx) and decreasing footshock intensity (0.3 mA instead of 0.4 mA) with the aim of enhancing preference for the dark compartment did not lead to any different conclusion ($p > 0.3$; experiment performed in a separate group of mice, data not shown).

During cued fear conditioning, mice of both groups showed a progressive acquisition of associative fear learning (Fig. 3C; acquisition), as reflected by increases in the percent time spent expressing a fear response (% freezing; $p < 0.001$) during delivery of the

five conditioning auditory stimuli (CS). However, *mdx* mice showed a reduced rate of acquisition compared to WT mice (genotype \times trial interaction: $p < 0.05$), with shorter periods of freezing across CS-US pairings (genotype effect: $p < 0.01$), yet they finally reached a level of performance comparable to that of WT mice during the last CS-US delivery. In contrast, the amount of freezing was comparable between genotypes during the inter-trial intervals that followed US delivery ($p > 0.05$; not shown), indicating comparable responsiveness to the pain induced by the electric shock and highlighting that the deficit in *mdx* mice was specifically expressed in response to the CS. On the next day (retention 1, 24 h later), 16 CS were successively delivered without US. *Mdx* mice showed a reduced amount of freezing compared to WT mice during the first

block of 4 CS ($p < 0.001$), while they later reached the same level of performance as WT mice during the last block (CS 18–21: $p > 0.1$). No extinction of the fear response was expressed in any group during this retention session. On the next day (retention 2, 48 h after the end of acquisition), the amount of freezing was again lower in *mdx* than in WT mice ($p < 0.05$), thus confirming the deficit in *mdx* mice. Separate groups of mice were submitted to two consecutive days of acquisition to increase the strength of acquisition (Fig. 3D). Analysis of performance confirmed the delayed acquisition in *mdx* mice during the first five CS–US pairings (genotype effect; first session: $p < 0.05$). During the second session performed in the same conditions, both genotypes expressed comparable performance ($p > 0.2$). However, this did not prevent expression of a long-term retention impairment in *mdx* mice during the retention session performed 24 h later in a new context ($p < 0.01$).

During trace fear conditioning the amount of freezing expressed in response to the CS was lower in *mdx* than in WT mice ($p < 0.05$), yet both genotypes reached comparable performance during the last trials (Fig. 3E, left panel). The magnitude of the genotype difference appeared to be milder in this experiment compared to that of the cued fear paradigms described above. However, it is noteworthy that the maximal performance achieved by WT mice was lower during trace fear conditioning than during cued fear conditioning, likely due to increased task difficulty. Moreover, the duration of the tone was 15 s instead of 30 s, which could have reduced detection of genotype differences in freezing. Quantification of freezing during a 45 s period including the tone delivery (15 s) and trace (30 s), however, confirmed the delayed acquisition in *mdx* mice ($p < 0.05$; Fig. 3E, middle panel). During the retention session performed 24 h later, *mdx* mice exhibited a deficit in performance during presentation of the CS alone ($p < 0.05$; Fig. 3E, right panel). No genotype difference was detected during the context test performed 3 h later (not shown).

3.4. Spatial cognitive flexibility and working memory

To address cognitive flexibility, mice were first submitted to a reference spatial memory task followed by reversal learning in a water maze. No main genotype difference was detected for the time needed to reach the platform (not shown) and distance swum to the platform (Fig. 4A) during either acquisition or reversal sessions. However, both parameters were associated with a significant genotype \times day interaction during the acquisition phase (time to platform: $p < 0.05$; distance: $p < 0.05$), suggesting altered performance progression in *mdx* mice during training. This was confirmed by a reduced path efficiency in *mdx* mice during the acquisition phase (genotype effect: $p < 0.05$; Fig. 4B). This was not associated with differences in swim speed ($p > 0.1$) or thigmotaxis ($p > 0.3$), suggesting genuine alteration in learning processes. Of note, however, the swim speed was transiently reduced in *mdx* mice during the first 3 days of training ($p < 0.001$), a period during which they expressed longer times to reach the platform ($p < 0.05$) and did not show improvement in the distance swum to the platform in contrast to WT mice (genotype \times distance interaction: $p < 0.01$), suggesting a deficit in procedural learning during the first training sessions in *mdx* mice. Reversal on day 15 induced a drop in performance in both *mdx* and WT mice, characterized by a longer distance swum to the platform compared to the last days of acquisition (last training vs first reversal sessions: $p < 0.01$; genotype \times sessions interaction: $p > 0.6$). No difference was found between genotypes during reversal learning for any parameter. Both groups displayed comparable number of crossings of the previous target position ($p > 0.9$), distance swum in the quadrant and annulus surrounding the previous target position (not shown).

The relationship between cognitive flexibility and spatial working memory was investigated in the radial maze. Mice were first

submitted to a win-stay paradigm, during which only one arm was baited (always the same for a given mouse) during 10 days (acquisition; 6 trials per day), and then to a 5-day reversal phase during which the bait was moved to a different arm (reversal). During the initial 2-day habituation phase, *mdx* and WT mice had comparable latencies to visit the first arm ($p > 0.2$, not shown) and visited the same number of arms ($p > 0.1$, not shown). In both genotypes, the latency of the first visit was shorter ($p < 0.05$) and the total number of visits was conversely larger ($p < 0.001$) during the second day, indicating rapid familiarization to the maze. Latencies then remained stable throughout the experiment ($p > 0.6$) and comparable in the two genotypes ($p > 0.7$). During acquisition, however, the time needed to complete a trial was longer in *mdx* mice ($p < 0.05$, not shown) and the number of trials during which mice failed to reach the cut-off criterion (21 arms visited or a trial duration of 5 min) tended to be larger in *mdx* than in WT mice ($p = 0.06$, not shown). Nevertheless, *mdx* mice progressively mastered the task as well as WT mice, as shown by the comparable number of reference memory errors in both genotypes ($p > 0.7$, Fig. 4C). Upon the first day of reversal, the number of reference memory errors increased in a similar manner in *mdx* and WT mice and both genotypes rapidly learned the new baited arm location within the 5-day reversal phase. This task also allowed us to analyze spatial working memory performance, defined as the number of re-entries into unbaited arms within a trial (Fig. 4D). The number of working memory errors was statistically comparable between genotypes across acquisition sessions (Fig. 4D; reversal). In this paradigm, reversal typically induced a renewed increase in the number of working memory errors (Fig. 4D; reversal) (Björklund et al., 2001). However, working memory errors were significantly less frequent in *mdx* compared to WT mice during the first reversal session ($p < 0.05$), but comparable between genotypes across the next sessions.

To further evaluate spatial working memory, we used a distinct protocol based on a win-shift strategy in the radial maze. In this task, each trial consisted in a presentation phase followed by a delayed choice phase (Fig. 4E). Mice were submitted to 2 trials per day during 7 days (acquisition), after which working memory was challenged by increasing the delay between the presentation and choice phases from 15 to 30 s (delay test; day 8) or by introducing a distracting object (marble) in the first third of each arm (distractor test; day 9) (Fig. 4F–H). During the presentation phase, the number of re-entries into the 3 baited arms was considered as a first evaluation of working memory performance. The mean rate of this type of error was $< 15\%$ of the total number of visits (Fig. 4F). No significant difference was detected between genotypes on this parameter during acquisition, the delay test or the distractor test. During the test phase, two types of errors were quantified separately to evaluate working memory performance: type 1 errors were defined as entries into one of the 3 arms that were previously explored during the presentation phase (Fig. 4G) while type 2 errors were defined as re-entries into any of the 3 different baited arms of this choice phase (Fig. 4H). Type 1 errors were relatively more often observed ($\sim 30\%$ of total visits) than type 2 errors ($\sim 4\text{--}10\%$) in both genotypes, and showed no marked changes during the delay or distractor tests. No significant genotype difference was detected for any type of errors during acquisition, delay test or distractor test.

4. Discussion

Pioneer studies in dystrophin-deficient *mdx* mice provided evidence that the mice present a wide range of cognitive deficits characterized by long-term retention deficits in various learning and memory tasks, suggesting dysfunction of consolidation processes

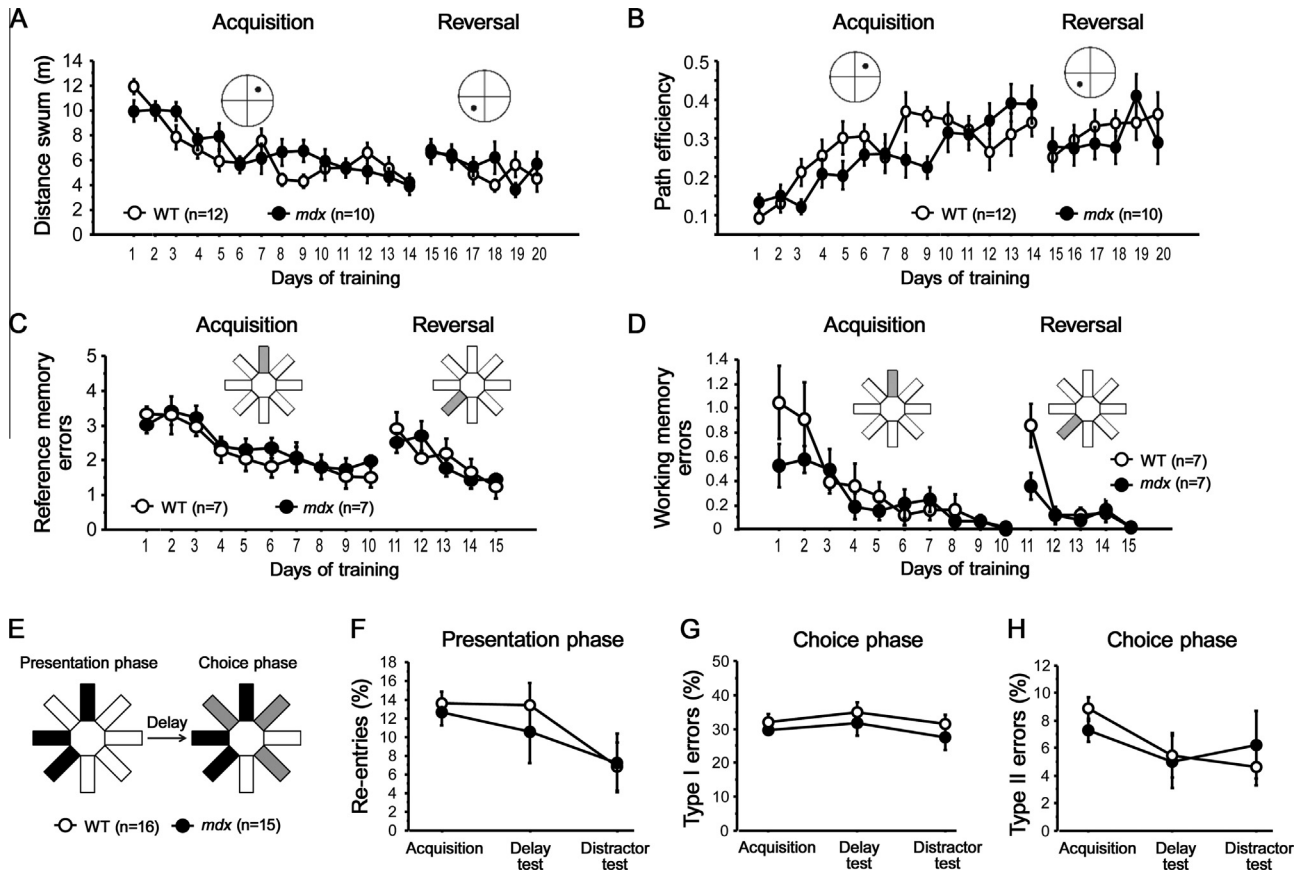


Fig. 4. Spatial learning and memory in WT and *mdx* mice. (A and B) Spatial learning (days 1–14) and reversal (days 15–20) in the water maze task. During reversal, the platform was moved to the opposite quadrant (see drawing insets). Performance is represented by the distance swum to reach the platform (A) and the path efficiency (B), an index of the efficiency of the path from start to platform position with a score of 1 indicating perfect efficiency (straight line trajectory). (C and D) Spatial learning (days 1–10) and reversal (days 11–15) in the radial-arm maze. The baited-arm position remained constant during acquisition, and was then moved 135° anticlockwise for reversal learning (see drawing insets). Performance is represented by the number of reference memory errors defined as first visits into non-baited arms and working memory errors defined as re-entries into non-baited arms. (E and H) Spatial working memory. Each trial (E) started by a presentation phase during which mice can access only three arms (black arms), followed, after 15-s isolation on the central platform, by a choice phase during which mice had access to the three previously baited arms and three novel arms (E, gray arms). Distinct sets of arms were used across trials. Working memory was first evaluated during 7 days and then challenged by increasing the delay between phases (15–30 s, delay test, day 8) or by introducing in each arm a distracting object at the first third of their length (distractor test, day 9). (F) Number of re-entries into baited arms during the presentation phase. (G) Number of type I working memory errors defined as entries into any of the 3 arms previously explored during the presentation phase. (H) Number of type II working memory errors defined as re-entries into any of the 3 novel baited arms of this choice phase.

that depend on hippocampal integrity, rather than genuine impairments in acquisition and/or short-term processing of information (reviewed in Perronnet & Vaillend, 2010). In the present study, however, we found that both acquisition and retention of fear memories are impaired in *mdx* mice. Because asymptotic learning performance is normally achieved within minutes in a single conditioning session, it may not implicate a slow-building consolidation process. Our results therefore suggest for the first time that acquisition processes are impaired during associative learning in dystrophin-deficient mice. In cued fear conditioning, additional training during a second acquisition session 24 h after the first training session allowed *mdx* mice to display a level of performance comparable to that of WT mice during the second session. However, this did not prevent expression of a retention deficit 24 h post-conditioning in *mdx* mice, suggesting that consolidation/recall processes were also altered.

There is no overt evidence for a putative altered expression of fear that could account for the performance deficit of *mdx* mice during acquisition of the CS–US association, and we showed that their behavioral responses to electric shocks are comparable to that of littermate controls, suggesting unaffected algesia. Although *mdx* mice do not show severe muscle wasting up to one year old due to compensatory muscle regeneration (Pastoret

& Seville, 1995), younger adult *mdx* mice may display reduced muscle force, motor uncoordination, hypoactivity and enhanced emotional reactivity in response to stressful events, which could affect behavioral responses in this model (e.g., Goyenvalle et al., 2015; Grady, Wozniak, Ohlemiller, & Sanes, 2006; Perronnet et al., 2012; Sekiguchi et al., 2009; Vaillend et al., 2004). However, the young adult *mdx* mice tested here (10–16 weeks old) did not show major motor deficits, as their activity during habituation sessions as well as their swim speed and latencies to find the platform in the water maze and to visit arms in the radial-arm maze were globally unaffected. Moreover, the motor deficits and increased fearfulness in *mdx* mice are usually associated with longer periods of immobility compared to WT mice, whereas the fear conditioning deficits reported here were characterized by a reduced duration of immobility (freezing). Therefore, it seems unlikely that the learning and memory deficits in *mdx* mice could be secondary to motor dysfunction.

A complex set of interacting factors and cognitive processes required for initial memory processing could potentially be affected by the loss of brain dystrophin, due to its widespread expression in the nervous system, including in sensory organs. Although dystrophin is normally expressed in the inner and outer hair cells of the cochlea (Dodson et al., 1995), we demonstrated

here that auditory brainstem responses are unaltered in *mdx* mice, suggesting a minor impact of dystrophin loss in the initial steps of auditory perception. This was confirmed by our observation of typical orientation behavior toward auditory tones during fear conditioning. Likewise, despite loss of dystrophin expression in photoreceptor terminals and inner nuclear layer neurons (Wersinger et al., 2011), *mdx* mice have normal electroretinogram (Pillers et al., 1999b) and preserved visual capacities in spatial learning tasks (Vaillend et al., 1998; Vaillend et al., 2004). Hence, the putative role of dystrophin Dp427 in sensory perception appears to be of minor importance. Interestingly, dysfunction of visuospatial memory was reported in DMD patients with distal mutations affecting C-terminal dystrophin products (D'Angelo et al., 2011), suggesting that other forms of dystrophin may have a more important function in sensory functions. Beyond sensory perception, certain DMD patients present features of children with sensory processing disorders, though this is not currently included in diagnosis strategies for DMD (Poysky & Behavior in DMD Study Group, 2007). It is however important to determine whether dystrophin loss may modify the ability to detect, modulate and/or respond appropriately to sensory stimuli, as this might contribute to the altered auditory working-memory load and delayed language acquisition often reported in DMD patients, and, in *mdx* mice, to the deficits observed in learning an association between an auditory stimulus and an aversive event. To address this issue for the first time, we investigated the capacity of *mdx* mice to filter and gate auditory inputs using prepulse inhibition (PPI) of the acoustic startle reflex, a translational model frequently used to detect deficits in sensorimotor gating or early attentional control in neuropsychiatric disorders (Kohl, Heekeren, Klosterkötter, & Kuhn, 2013; Powell, Zhou, & Geyer, 2009). PPI is based on the delivery of a weak auditory prepulse that attenuates the response to a subsequent startling stimulus. It is regulated by a cortico-limbic striato-pallidal circuit and modulated by various neurotransmitters including GABA (e.g., Leppä et al., 2011; Yeomans et al., 2010), and is thought to be predictive of performance in cognitive tasks. In this test, *mdx* mice displayed normal levels of PPI in response to various prepulse intensities and various intervals between the prepulse and the startling stimulus, suggesting that the initial processing of sensory inputs is not altered.

Defining the neuroanatomical basis of impaired fear conditioning in *mdx* mice is complex, as the synaptic expression of dystrophin Dp427 encompass all cortices and several subcortical brain structures (Lidov et al., 1993). The main brain structures that could underlie acquisition and retention deficits in both auditory-cued delay and trace fear conditioning, as demonstrated here in *mdx* mice, are the amygdalar nuclei (lateral, basolateral and central nuclei), the thalamus and the auditory cortex, albeit the periaqueductal gray and the striatum (caudate putamen, nucleus accumbens) have also been involved in these processes (Herry & Johansen, 2014). However, the thalamus, periaqueductal gray and striatum do not normally express dystrophin, the striatum being used as a control structure in some studies (Knuesel et al., 1999; Lidov et al., 1993). Besides, the unaltered modulation of the acoustic startle reflex in *mdx* mice suggests that the function of auditory cortices, as well as of cochlear, brainstem and motor neurons, are largely unaffected (Koch, 1999). Hence, amygdalar dysfunction appears to be a main hypothesis to explain the fear conditioning deficits in *mdx* mice, in line with the proposed neurobiological basis of enhanced defensive behavior in this model (Sekiguchi et al., 2009). We cannot rule out that other structures contributing to fear conditioning processes, such as the hippocampus, cerebellum and other cortical areas (e.g., entorhinal and perirhinal cortices) (Esclassan, Coutureau, Di Scala, & Marchand, 2009a; Esclassan, Coutureau, Di Scala, & Marchand, 2009b; LeDoux, 2000), may participate to the observed deficits. These

structures normally express dystrophin Dp427. Moreover, an impaired clustering of GABA_A receptors has been characterized in *mdx* mice in central inhibitory synapses in hippocampus, amygdala and cerebellum – but not in the striatum – (Knuesel et al., 1999; Sekiguchi et al., 2009; Vaillend et al., 2010) and this has been associated with altered synaptic plasticity in these structures (Anderson, Morley, & Head, 2010; Dallérac et al., 2011; Sekiguchi et al., 2009; Vaillend et al., 2004). Altered GABAergic function in these regions could be a basis of the learning and memory deficits in *mdx* mice (Makkar, Zhang, & Cranney, 2010), since previous studies unveiled hippocampal-dependent (Perronnet & Vaillend, 2010; for a review) and cerebellum-dependent deficits in this model (Grady et al., 2006), while our present results suggest a major involvement of the amygdala. GABAergic function has not been assessed in cortical areas of *mdx* mice, but several studies highlighted widespread changes in the density and spatial organization of cortical interneurons: Initial studies pointed to the sensorimotor cortex (Sbriccoli et al., 1995), but it remained unclear whether the changes reflected a brain deterioration secondary to altered motor input or a primary central alteration. Further investigations revealed alterations in cortical areas not primarily related to sensorimotor integration, such as in the anterior cingulate cortex (Carretta et al., 2004), suggesting that the integrity of several cortical areas might be compromised.

Because deficits in working memory and executive functions in DMD have not been associated with specific individual profiles of mutations in the *dmd* gene (Hinton et al., 2000; Hinton et al., 2001; Snow et al., 2013), and as altered expression of α_1 and α_2 subunits of the GABA_A receptor in the prefrontal cortex is a potential risk factor for working memory deficits (e.g., Hashimoto et al., 2009; Volk et al., 2002), we hypothesized that the altered GABA_A-receptor clustering due to dystrophin loss may result in such cognitive dysfunction in *mdx* mice. As spatial reference memory is unaffected in *mdx* mice (Sesay, Errington, Levita, & Bliss, 1996; Vaillend et al., 1998; Vaillend et al., 2004), we examined executive functions in spatial working memory and reversal learning paradigms in radial and water mazes. This allowed us to dissociate temporary information storage from learning strategies and cognitive flexibility, which are critical functions to learn associations between temporally contingent stimuli and to better cope with changing environments. In the water maze, *mdx* mice showed an initial delay in performance improvement during the first three sessions, suggesting a transient deficit in procedural learning that could be linked to the reduced motor coordination previously reported in this model (Grady et al., 2006). Performance during additional training sessions was comparable between genotypes. Nevertheless, a fine analysis of navigational strategy revealed reduced path efficiency in *mdx* mice, suggesting defective control processes that normally enable performance optimization in cognitive tasks. This also suggests that apparently normal or borderline learning performance in dystrophin-deficient mice may mask qualitative alterations in learning and memory processes. Such alterations might rely on cerebellar contribution to cognitive functions (Rondi-Reig & Burguière, 2005), a hypothesis also suggested to account for the cognitive and communicative deficits in DMD patients (Cyrułnik & Hinton, 2008). At the end of the training periods in both water and radial maze experiments, mice of both genotypes mastered the win-stay spatial learning tasks. We then challenged their cognitive flexibility by confronting them to reversal of the learning rule during which learned contingencies did not apply anymore, leading to higher cognitive load. The consequential increases in reference and working memory errors were not larger in *mdx* mice than in WT littermates. On the contrary, working memory errors in the radial maze were higher in WT mice upon reversal, which we attribute to their higher level of locomotor activity compared to *mdx* mice in this task. In a win-shift paradigm

in the radial maze, working memory performance was also unaltered in *mdx* mice and remained unaffected by the presence of a distractor or by an increase in the interval during which more prolonged storage of information was needed to express correct performance. This suggests a relative integrity of the executive processes involved during spatial learning. A major dysfunction of the prefrontal cortex seems unlikely, as *mdx* mice do not show any impairment in reversal/extinction paradigms and PPI of the acoustic startle reflex (see also Vaillend & Ungerer, 1999).

5. Conclusion

The hypothesis that impaired long-term memory may contribute to impaired learning performance in DMD has been recently raised (Lorusso et al., 2013). The long-term memory deficits displayed by *mdx* mice in various learning tasks suggest a direct link with the loss of the full-length brain dystrophin (Dp427), which is absent in all DMD patients. In the present study we found that both acquisition and long-term retention of fear memories are defective in *mdx* mice. The neuroanatomical substrate of these deficits remains to be specified, although involvement of a dysfunctional circuit including the amygdala is suspected, in line with the molecular and neurophysiological alterations previously reported in this structure. In contrast, the absence of brain dystrophin does not modify the perception and gating of sensory inputs and does not impair spatial working memory performance and spatial cognitive flexibility. In all, the brain dystrophin Dp427 appears to play a role during acquisition of associative learning as well as in general processes involved in memory consolidation. This is in accordance with recent single variant and gene-based analyses showing that *dmd*-gene variants affecting this full-length brain dystrophin are associated with general variability of cognitive ability in healthy human populations (Vojinovic et al., 2014).

Acknowledgments

This work was supported by the AFM (Association Française contre les Myopathies, France), Grant #15299 NeuroDYS to C.V.; the Centre National de la Recherche Scientifique (France); and the University Paris-Sud (France). The authors are grateful to P. Leblanc-Veyrac, N. Samson, J. Sempé and N. Dherbe for mouse breeding, care and genotyping.

References

- Anderson, J. L., Morley, J. W., & Head, S. I. (2010). Enhanced homosynaptic LTD in cerebellar Purkinje cells of the dystrophic MDX mouse. *Muscle and Nerve*, *41*(3), 329–334.
- Björklund, M., Siverina, I., Heikkinen, T., Tanila, H., Sallinen, J., Scheinin, M., et al. (2001). Spatial working memory improvement by an alpha2-adrenoceptor agonist dexmedetomidine is not mediated through alpha2C-adrenoceptor. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *25*, 1539–1554.
- Carretta, D., Santarelli, M., Sbriccoli, A., Pinto, F., Catini, C., & Minciacchi, D. (2004). Spatial analysis reveals alterations of parvalbumin- and calbindin-positive local circuit neurons in the cerebral cortex of mutant *mdx* mice. *Brain Research*, *1016*(1), 1–11.
- Chabout, J., Cressant, A., Hu, X., Edeline, J. M., & Granon, S. (2013). Making choice between competing rewards in uncertain vs. safe social environment: Role of neuronal nicotinic receptors of acetylcholine. *Frontiers in Human Neuroscience*, *7*, 468.
- Cyrulnik, S. E., & Hinton, V. J. (2008). Duchenne muscular dystrophy: A cerebellar disorder? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *32*, 486–496.
- Dallérac, G., Perronnet, C., Chagneau, C., Leblanc-Veyrac, P., Samson-Desvignes, N., Peltekian, E., et al. (2011). Rescue of a dystrophin-like protein by exon skipping normalizes synaptic plasticity in the hippocampus of the *mdx* mouse. *Neurobiology of Disease*, *43*, 635–641.
- D'Angelo, M. G., Lorusso, M. L., Civati, F., Comi, G. P., Magri, F., Del Bo, R., et al. (2011). Neurocognitive profiles in Duchenne muscular dystrophy and gene mutation site. *Pediatric Neurology*, *45*, 292–299.
- Desguerre, I., Christov, C., Mayer, M., Zeller, R., Becane, H. M., Bastuji-Garin, S., et al. (2009). Clinical heterogeneity of duchenne muscular dystrophy (DMD): Definition of sub-phenotypes and predictive criteria by long-term follow-up. *PLoS ONE*, *4*, e4347.
- Dodson, H. C., Piper, T. A., Clarke, J. D., Quinlivan, R. M., & Dickson, G. (1995). Dystrophin expression in the hair cells of the cochlea. *Journal of Neurocytology*, *24*, 625–632.
- Donders, J., & Taneja, C. (2009). Neurobehavioral characteristics of children with Duchenne muscular dystrophy. *Child Neuropsychology*, *15*, 295–304.
- Esclassan, F., Coutureau, E., Di Scala, G., & Marchand, A. R. (2009a). Differential contribution of dorsal and ventral hippocampus to trace and delay fear conditioning. *Hippocampus*, *19*(1), 33–44.
- Esclassan, F., Coutureau, E., Di Scala, G., & Marchand, A. R. (2009b). A cholinergic-dependent role for the entorhinal cortex in trace fear conditioning. *Journal of Neuroscience*, *29*(25), 8087–8093.
- Gourévitch, B., Doisy, T., Avillac, M., & Edeline, J. M. (2009). Follow-up of latency and threshold shifts of auditory brainstem responses after single and interrupted acoustic trauma in guinea pig. *Brain Research*, *1304*, 66–79.
- Goyenvalle, A., Griffith, G., Babbs, A., El Andaloussi, S., Ezzat, K., Avril, A., et al. (2015). Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. *Nature Medicine*, *21*(3), 270–275.
- Grady, R. M., Wozniak, D. F., Ohlemiller, K. K., & Sanes, J. R. (2006). Cerebellar synaptic defects and abnormal motor behavior in mice lacking alpha- and beta-dystrobrevin. *The Journal of Neuroscience*, *26*, 2841–2851.
- Hashimoto, T., Nguyen, Q. L., Rotaru, D., Keenan, T., Arion, D., Beneyto, M., et al. (2009). Protracted developmental trajectories of GABAA receptor alpha1 and alpha2 subunit expression in primate prefrontal cortex. *Biological Psychiatry*, *65*, 1015–1023.
- Herry, C., & Johansen, J. P. (2014). Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. *Nature Neuroscience*, *17*(12), 1644–1654.
- Hinton, V. J., De Vivo, D. C., Nereo, N. E., Goldstein, E., & Stern, Y. (2000). Poor verbal working memory across intellectual level in boys with Duchenne dystrophy. *Neurology*, *54*, 2127–2132.
- Hinton, V. J., De Vivo, D. C., Nereo, N. E., Goldstein, E., & Stern, Y. (2001). Selective deficits in verbal working memory associated with a known genetic etiology: The neuropsychological profile of duchenne muscular dystrophy. *Journal of the International Neuropsychological Society*, *7*, 45–54.
- Knuesel, I., Mastrocola, M., Zuellig, R. A., Bornhauser, B., Schaub, M. C., & Fritschy, J. M. (1999). Short communication: Altered synaptic clustering of GABAA receptors in mice lacking dystrophin (*mdx* mice). *European Journal of Neuroscience*, *11*, 4457–4462.
- Koch, M. (1999). The neurobiology of startle. *Progress in Neurobiology*, *59*(2), 107–128.
- Kohl, S., Heekeren, K., Klosterkötter, J., & Kuhn, J. (2013). Prepulse inhibition in psychiatric disorders—apart from schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, *47*, 445–452.
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, *23*, 155–184.
- Leppä, E., Linden, A. M., Vekovischeva, O. Y., Swinny, J. D., Rantanen, V., Toppila, E., et al. (2011). Removal of GABA(A) receptor $\gamma 2$ subunits from parvalbumin neurons causes wide-ranging behavioral alterations. *PLoS ONE*, *6*, e24159.
- Lidov, H. G., Byers, T. J., & Kunkel, L. M. (1993). The distribution of dystrophin in the murine central nervous system: An immunocytochemical study. *Neuroscience*, *54*, 167–187.
- Lorusso, M. L., Civati, F., Molteni, M., Turconi, A. C., Bresolin, N., & D'Angelo, M. G. (2013). Specific profiles of neurocognitive and reading functions in a sample of 42 Italian boys with Duchenne Muscular Dystrophy. *Child Neuropsychology*, *19*, 350–369.
- Makkar, S. R., Zhang, S. Q., & Cranney, J. (2010). Behavioral and neural analysis of GABA in the acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of fear memory. *Neuropsychopharmacology*, *35*, 1625–1652.
- Mento, G., Tarantino, V., & Bisiacchi, P. S. (2011). The neuropsychological profile of infantile Duchenne muscular dystrophy. *The Clinical Neuropsychologist*, *25*, 1359–1377.
- Miranda, R., Sébrié, C., Degrouard, J., Gillet, B., Jaillard, D., Laroche, S., et al. (2009). Reorganization of inhibitory synapses and increased PSD length of perforated excitatory synapses in hippocampal area CA1 of dystrophin-deficient *mdx* mice. *Cerebral Cortex*, *19*, 876–888.
- Pastoret, C., & Sebille, A. (1995). *Mdx* mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *Journal of Neurological Science*, *129*(2), 97–105.
- Paxinos, G., Franklin, K. B. J. (2001). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed. Academic Press, San Diego (CA).
- Perronnet, C., Chagneau, C., Le Blanc, P., Samson-Desvignes, N., Mornet, D., Laroche, S., et al. (2012). Upregulation of brain utrophin does not rescue behavioral alterations in dystrophin-deficient mice. *Human Molecular Genetics*, *21*, 2263–2276.
- Perronnet, C., & Vaillend, C. (2010). Dystrophins, utrophins, and associated scaffolding complexes: Role in mammalian brain and implications for therapeutic strategies. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2010*, 849426.
- Piccini, G., Gazzellini, S., D'Amico, A., Pane, M., Castelli, E., Vicari, S., et al. (2014). Developmental lag of visuospatial attention in Duchenne muscular dystrophy. *Research in Developmental Disabilities*, *36*, 55–61.
- Pillers, D. A., Duncan, N. M., Dwinnell, S. J., Rash, S. M., Kempton, J. B., & Trune, D. R. (1999a). Normal cochlear function in *mdx* and *mdx*(Cv3) Duchenne muscular dystrophy mouse models. *The Laryngoscope*, *109*, 1310–1312.
- Pillers, D. A., Weleber, R. G., Green, D. G., Rash, S. M., Dally, G. Y., Howard, P. L., et al. (1999b). Effects of dystrophin isoforms on signal transduction through neural

- retina: Genotype–phenotype analysis of duchenne muscular dystrophy mouse mutants. *Molecular Genetics and Metabolism*, 66, 100–110.
- Powell, S. B., Zhou, X., & Geyer, M. A. (2009). Prepulse inhibition and genetic mouse models of schizophrenia. *Behavioural Brain Research*, 204, 282–294.
- Poysky, J. Behavior in DMD Study Group. (2007). Behavior patterns in Duchenne muscular dystrophy: Report on the Parent Project Muscular Dystrophy behavior workshop 8–9 of December 2006, Philadelphia, USA. *Neuromuscular Disorders*, 17, 986–994.
- Raynor, E. M., & Mulroy, M. J. (1997). Sensorineural hearing loss in the mdx mouse: A model of Duchenne muscular dystrophy. *The Laryngoscope*, 107, 1053–1056.
- Rondi-Reig, L., & Burguière, E. (2005). Is the cerebellum ready for navigation? *Progress in Brain Research*, 148, 199–212.
- Sbriccoli, A., Santarelli, M., Carretta, D., Pinto, F., Granato, A., & Minciocchi, D. (1995). Architectural changes of the cortico-spinal system in the dystrophin defective mdx mouse. *Neuroscience Letters*, 200(1), 53–56.
- Sekiguchi, M., Zushida, K., Yoshida, M., Maekawa, M., Kamichi, S., Yoshida, M., et al. (2009). A deficit of brain dystrophin impairs specific amygdala GABAergic transmission and enhances defensive behaviour in mice. *Brain*, 132, 124–135.
- Sesay, A. K., Errington, M. L., Levita, L., & Bliss, T. V. (1996). Spatial learning and hippocampal long-term potentiation are not impaired in mdx mice. *Neuroscience Letters*, 211, 207–210.
- Snow, W. M., Anderson, J. E., & Jakobson, L. S. (2013). Neuropsychological and neurobehavioral functioning in Duchenne muscular dystrophy: A review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37, 743–752.
- Vaillend, C., Billard, J. M., Claudepierre, T., Rendon, A., Dutar, P., & Ungerer, A. (1998). Spatial discrimination learning and CA1 hippocampal synaptic plasticity in mdx and mdx3cv mice lacking dystrophin gene products. *Neuroscience*, 86, 53–66.
- Vaillend, C., Billard, J. M., & Laroche, S. (2004). Impaired long-term spatial and recognition memory and enhanced CA1 hippocampal LTP in the dystrophin-deficient Dmd(mdx) mouse. *Neurobiology of Disease*, 17, 10–20.
- Vaillend, C., Perronnet, C., Ros, C., Gruszczynski, C., Goyenvalle, A., Laroche, S., et al. (2010). Rescue of a dystrophin-like protein by exon skipping in vivo restores GABA_A-receptor clustering in the hippocampus of the mdx mouse. *Molecular Therapy*, 18, 1683–1688.
- Vaillend, C., Rendon, A., Misslin, R., & Ungerer, A. (1995). Influence of dystrophin-gene mutation on mdx mouse behavior. I. Retention deficits at long delays in spontaneous alternation and bar-pressing tasks. *Behavior Genetics*, 25, 569–579.
- Vaillend, C., & Ungerer, A. (1999). Behavioral characterization of mdx3cv mice deficient in C-terminal dystrophins. *Neuromuscular Disorders*, 9(5), 296–304.
- Vojinovic, D., Adams, H. H., van der Lee, S. J., Ibrahim-Verbaas, C. A., Brouwer, R., van den Hout, M. C., et al. (2014). The dystrophin gene and cognitive function in the general population. *European Journal of Human Genetics*.
- Volk, D. W., Pierri, J. N., Fritschy, J. M., Auh, S., Sampson, A. R., & Lewis, D. A. (2002). Reciprocal alterations in pre- and postsynaptic inhibitory markers at chandelier cell inputs to pyramidal neurons in schizophrenia. *Cerebral Cortex*, 12, 1063–1070.
- Waite, A., Tinsley, C. L., Locke, M., & Blake, D. J. (2009). The neurobiology of the dystrophin-associated glycoprotein complex. *Annals of Medicine*, 41, 344–359.
- Wersinger, D., Bordais, A., Schwab, Y., Sene, A., Bénard, R., Alunni, V., et al. (2011). Reevaluation of dystrophin localization in the mouse retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52, 7901–7908.
- Wicksell, R. K., Kihlgren, M., Melin, L., & Eeg-Olofsson, O. (2004). Specific cognitive deficits are common in children with Duchenne muscular dystrophy. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 46, 154–159.
- Willott, J. F. (2006). Measurement of the auditory brainstem response (ABR) to study auditory sensitivity in mice. *Current Protocols in Neuroscience*, Unit 8.21B (Chapter 8).
- Yeomans, J. S., Bosch, D., Alves, N., Daros, A., Ure, R. J., & Schmid, S. (2010). GABA receptors and prepulse inhibition of acoustic startle in mice and rats. *The European Journal of Neuroscience*, 31, 2053–2061.

II. Emotions, fonctions motrices, Cognition et dysfonctions GABAergiques

1. Contexte de l'étude

Des études récentes ont mis en évidence un rôle inattendu pour la dystrophine complète Dp427, protéine responsable de la myopathie de Duchenne, dans les réponses de peur et de stress. Chez la souris *mdx*, les réponses de peur suite à un stress léger sont caractérisées par une immobilité tonique (*freezing*) exacerbée, qui rappelle le comportement exprimé par certaines espèces animales en présence d'un prédateur. Un rôle cérébral de cette protéine dans les processus émotionnels est fort probable, puisque ce phénotype peut être modulé par restauration ciblée de la dystrophine dans le cerveau (Sekiguchi *et al.*, 2009) ou par des modifications de l'environnement olfactif du contexte expérimental (Yamamoto *et al.*, 2010).

Bien caractériser ces processus comportementaux est un défi essentiel pour la prise en charge des patients, qui présentent des altérations intellectuelles, comportementales et émotionnelles. De plus, ils peuvent constituer un très bon biomarqueur pour la validation des outils de thérapie génique visant à restaurer l'expression de la dystrophine dans le cerveau. Enfin, la réponse de peur se caractérise par une inhibition motrice durable et forte chez la souris, pouvant biaiser l'interprétation de certaines études comportementales si elle n'est pas prise en compte. La dystrophine est une protéine normalement exprimée à la membrane postsynaptique des synapses inhibitrices en interaction avec les récepteurs du GABA mais l'hypothèse d'une relation possible entre les modifications GABAergiques et l'expression de réponses émotionnelles et/ou motrices anormales n'avait pas été encore étudiée.

Dans cette étude, nous avons donc évalué les causes et les conséquences de l'immobilité engendrée par ces réponses de peur exacerbées, ainsi que l'effet d'un activateur sélectif des récepteurs au GABA extrasynaptiques, suspectés d'être altérés chez la souris *mdx*.

2. Méthodologie

Les tests comportementaux réalisés sont classiquement utilisés dans notre équipe, utilisant pour certains un logiciel de suivi et d'analyse vidéo éprouvé (Any-Maze) dont certaines fonctionnalités ont été spécifiquement demandées au développeur pour nos besoins d'analyses. L'éclairage lumineux est vérifié au début de chaque expérimentation, pour les tests en champ ouvert, en labyrinthe en croix surélevé et dans le test de choix clair-obscur, où ce paramètre est crucial dans les réponses d'anxiété et de stress des animaux. Une analyse fine des propriétés du haut-parleur de la cage de comportement utilisée pour le conditionnement de peur a été réalisée avec l'aide de chercheurs de notre unité spécialisés en bioacoustique (T. Aubin, J.-M. Edeline) et nous avons choisi de ne pas utiliser la fréquence de 8 kHz (bien qu'à cette fréquence l'animal possède une audition optimale) car le haut-parleur présentait une mauvaise restitution acoustique à cette fréquence au contraire des sons de 10 kHz que nous avons utilisés. La mesure de

l'immobilité tonique effectuée à l'aide d'une grille piézo-électrique a été préalablement comparée à un suivi manuel par vidéo afin de s'assurer de la validité de nos mesures des réponses de peur (*freezing*) dans cet appareil. Enfin, pour le test du réflexe de redressement, l'appareil en forme de V en polycarbonate a été spécifiquement construit, selon nos plans et en accord avec ce qui avait déjà été réalisé dans la littérature. De plus, les expériences ont été réalisées uniquement le matin, afin de s'affranchir des variations du cycle circadien, qui pouvait interférer avec l'usage du gaboxadol (Lundbeck et Merck l'ayant testés dans le traitement de l'insomnie ; voir Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1977 et le brevet américain n°4,278,676¹¹).

3. Résultats

Nous montrons que les réponses de peur inconditionnées (*freezing*) sont augmentées, durables et résistantes à l'extinction chez la souris *mdx*. Constantes entre 3 et 9 mois alors que l'atteinte musculaire évolue au cours de cette période, elles ne dépendent donc pas directement d'altérations périphériques. Une sensibilité accrue à la douleur a été réfutée, de même qu'une altération endocrinienne, la sécrétion d'adrénocorticotrophine étant normale suite à un stress chez ces souris. Les réponses comportementales traduisant la dépression ne sont pas altérées, de même que l'exploration d'un nouvel environnement, cependant des déficits exploratoires en champ ouvert sont mis en évidence, ainsi qu'une augmentation de l'anxiété dans un test de clair-obscur. Nous avons également observé une inhibition motrice forte et durable suite à un stress léger dans le test de l'actimètre, et une forte corrélation entre stress et activité exploratoire même si un délai de plusieurs jours sépare les deux événements. De toute évidence l'augmentation des réponses de peur inconditionnées chez la souris *mdx* ont un impact fort et durable sur leur activité locomotrice, suggérant qu'une part des phénotypes attribués à des déficits moteurs pourrait en fait résulter de perturbations émotionnelles. Ceci peut constituer un biais d'interprétation dans les études fonctionnelles visant à évaluer les effets d'un traitement de cette maladie. De plus, ces réponses de peur sont induites par des stress légers, ce qui suggère que de simples différences de manipulation des animaux pourraient expliquer la variabilité des résultats expérimentaux entre différents laboratoires.

Dans notre étude pharmacologique nous avons découvert que le comportement des souris *mdx* est plus sensible aux effets pharmacologiques du gaboxadol, ou THIP. Il s'agit d'un agoniste partiel des récepteurs du GABA ciblant spécifiquement la sous-unité δ extrasynaptique. Son effet est dépendant de la dose, anxiolytique puis sédatif et enfin hypnotique à forte dose. Chez la souris *mdx*, l'effet sédatif est augmenté et se traduit par la perte d'activité verticale en champ ouvert, tandis que l'effet hypnotique est caractérisé par une perte du réflexe de redressement, plus rapide et plus longue chez la souris *mdx*. Ces résultats suggèrent qu'il y a bien une altération du système GABAergique chez la souris *mdx* et qu'il touche le nombre ou les propriétés des récepteurs extrasynaptiques du GABA,

11. <http://www.patents.com/us-4278676.html>

cibles des anesthésies générales en clinique et modulateurs des mécanismes de la mémoire, de l'éveil et du sommeil.

4. Conclusion

Nous avons vu dans le premier article que la dystrophine semble jouer un rôle dans les processus d'acquisition et de rappel d'apprentissage et nous venons de voir ici qu'elle joue un rôle clef dans les processus émotionnels. En effet, bien que l'augmentation de la prévalence de l'anxiété et des troubles émotionnels puissent résulter de la condition physique des patients, notre étude sur la souris met en lumière le rôle de la Dp427 dans les fonctions liées à l'expression des émotions. Nos résultats sont en accord avec les études cliniques récentes suggérant que les altérations émotionnelles sont communes chez les patients DMD qui présentent une perte sélective de la dystrophine complète Dp427 (Ricotti, *et al.*, 2016). Ils suggèrent, de plus, que la perte de la Dp427 altère le circuit de la peur, incluant l'amygdale et les structures corticales, conduisant à une augmentation de la peur inconditionnée, de l'anxiété, ainsi que des déficits de peur conditionnée et de mémorisation. Ces traits comportementaux étant cruciaux pour la survie et la gestion des situations aversives, leur dérèglement peut entraîner une réactivité émotionnelle inappropriée, un comportement social inadapté ou une difficulté à utiliser ses capacités intellectuelles. Nous montrons également que l'augmentation de la réponse de peur chez la souris *mdx* induit une inhibition durable de la fonction motrice, mettant en évidence que le cerveau et les altérations comportementales peuvent avoir une influence significative sur les mesures motrices dans ce modèle expérimental.

Nous apportons également des éléments appuyant l'hypothèse actuelle que les altérations centrales dues à la perte de Dp427 pourraient reposer sur une mauvaise localisation spatiale des récepteurs GABA_A et à une altération de l'inhibition GABAergique tonique qui est principalement sous contrôle de récepteurs extrasynaptiques. Ces éléments doivent faire l'objet d'une attention particulière, tant dans les études précliniques chez la souris *mdx*, que dans la prise en charge des patients DMD.

Article n°2

**Relationships linking
emotional, motor,
cognitive and GABAergic
dysfunctions in
dystrophin-deficient *mdx*
mice**

ORIGINAL ARTICLE

Relationships linking emotional, motor, cognitive and GABAergic dysfunctions in dystrophin-deficient *mdx* mice

Cyrille Vaillend* and Rémi Chaussonnet

Neuroscience Paris-Saclay Institute (Neuro-PSI), UMR 9197, Université Paris Sud, CNRS, Université Paris Saclay, Orsay, France

*To whom correspondence should be addressed at: Neuroscience Paris-Saclay Institute (Neuro-PSI), CNRS UMR 9197, Université Paris Sud, Bâtiment 446, rue Claude Bernard, 91405 Orsay cedex, France. Tel: +33 169154985; Fax: +33 169157726; Email: cyrille.vaillend@u-psud.fr

Abstract

Alterations in the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene have been associated with enhanced stress reactivity in vertebrate species, suggesting a role for brain dystrophin in fear-related behavioral and cognitive processes. Because the loss of dystrophin (Dp427) reduces clustering of central γ -aminobutyric acid (GABA_A) receptors, it is suspected that local inhibitory tuning and modulation of neuronal excitability are perturbed in a distributed brain circuit that normally controls such critical behavioral functions. In this study, we undertook a large-scale behavioral study to evaluate fear-related behavioral disturbances in dystrophin-deficient *mdx* mice. We first characterized the behavioral determinants of the enhanced fearfulness displayed by *mdx* mice following mild acute stress and its association with increased anxiety and altered fear memories. We further demonstrated that this enhanced fearfulness induces long-lasting motor inhibition, suggesting that neurobehavioral dysfunctions significantly influence motor outcome measures in this model. We also found that *mdx* mice are more sensitive to the sedative and hypnotic effects of 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridin-3-ol hydrochlorid (THIP), a selective pharmacological activator of extrasynaptic GABA_A receptors involved in central tonic inhibition. Our results highlight that information on the emotional aspects of *mdx* mice are important to better understand the bases of intellectual and neuropsychiatric defects in DMD and to better define valuable functional readouts for preclinical studies. Our data also support the hypothesis that altered spatial localization of GABA_A receptors due to Dp427 loss is a pathological mechanism associated with brain dysfunction in DMD, suggesting that extrasynaptic GABA_A receptors might be candidate targets for future therapeutic developments.

Introduction

Recent studies have uncovered an unexpected role for dystrophin, the protein responsible for Duchenne/Becker muscular dystrophy (DMD/BMD), in fear and stress reactivity. This was first suggested by the enhanced fearfulness displayed by the dystrophin-deficient *mdx* mouse (1). Then, a high-throughput transcriptome analysis in Japanese quail lines revealed a significant association of the *dmd* gene with tonic immobility, an innate antipredator fear-related behavior, reminiscent of the

phenotype of the *mdx* mouse (2). Gene expression profiles in tadpoles also suggested *dmd* as a candidate predation-threat responsive gene (3). Moreover, polymorphisms in the *dmd* gene and decreases in dystrophin expression have been associated with a novel stress syndrome in commercial porcine populations, sometimes resulting in death during regular handling and transport for slaughter or following anesthesia (4). Obviously, this may be an issue regarding the welfare, health and care of commercial animals, as well as for the handling of

Received: October 11, 2016. Revised: December 21, 2016. Accepted: December 30, 2016

© The Author 2017. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

animal models used in research and preclinical testing of targeted therapies for muscular dystrophies (5–7). The phenotype appears to be independent from skeletal muscle impairment. Although a cardiac defect might be involved, a role for brain dystrophin in controlling emotional processes seems more likely, since fear responses can be significantly reduced in *mdx* mice by rescuing brain dystrophin expression with intracerebral administration of exon-skipping oligomers (1).

Characterizing the behavioral processes, influencing factors and consequences of the enhanced fearfulness resulting from defects in dystrophin is an important challenge, as this might constitute an overlooked endophenotype underlying part of the intellectual, behavioral and emotional disturbances associated with the DMD/BMD syndromes (8–11). Moreover, quantitative evaluation of fearfulness in animal models may provide a relevant readout in preclinical assessment of therapies targeting the central nervous system (12). Importantly, the expression of fearfulness is characterized by a strong motor inhibition with long-lasting freezing-like posture, which may represent a critical bias in the interpretation of functional outcome measures based on quantification of mobility or motor performance in animal models (<http://www.treat-nmd.eu/resources/research-resources/dmd-sops/>).

The central mechanisms underlying behavioral disturbances in *mdx* mice are still unclear. Dystrophin, or Dp427, is a 427 kDa protein normally expressed at the postsynaptic membrane in inhibitory synapses of principal neurons in several brain structures involved in cognition and emotional behavior, such as hippocampus, amygdala, cerebellum and sensory cortices. The loss of brain dystrophin in *mdx* mice induces aberrant molecular, structural and physiological changes in central inhibitory synapses (1,13–17), mainly characterized by alterations in the mechanisms regulating the clustering, density and/or properties of postsynaptic γ -aminobutyric acid (GABA_A) receptors [reviewed in (18)]. An abnormal distribution of GABA_A receptors has been recently confirmed in brain of DMD Patients (19) and emotional disturbances have been specifically associated with Dp427 loss in a recent clinical study (11). Although GABAergic dysfunction may broadly impact motor, emotional and cognitive functions, as well as responsiveness to specific anesthetics, its putative impact on *mdx* mice behavior has not been investigated to date.

In this study, we undertook a large-scale behavioral study to evaluate the determinants and consequences of the fear-related tonic immobility displayed by *mdx* mice. A variety of behavioral tests were used to characterize stress reactivity, emotional and motor functions, as well as aversive cue-outcome associative processes and fear memory. Because the specific GABAergic defect in *mdx* mice is thought to modify the density and/or function of extrasynaptic GABA receptors involved in central tonic inhibition (20), we also investigated for the first time the effect that a selective activator of these receptors may have on emotional and motor performance in this model.

Results

Robust and specific fear response following mild acute stress

The duration of stress-induced tonic immobility, considered as a measure of unconditioned fearfulness (1,2,21), was analyzed in *mdx* and WT littermate male mice in several experimental conditions associated with variable degrees of stress (Fig. 1). In a first experiment, mice aged 9 months were gently handled by

the tail and simply released in a novel cage without any prior restraint and their activity was videotracked for 5 min (Fig. 1A, Tail handling). The percent time spent immobile was <25% in both genotypes ($F_{1,20} = 3.4$, $P > 0.05$; NS), indicating that forced exploration of a small novel cage is not sufficient to induce fear responses in the mutants. On the next day, mice were submitted to a 15s scruff-restraint (Fig. 1A, scruff restraint). This manual restraint, similar to that currently used by laboratory experimenters to immobilize mice for standard examination or intraperitoneal (i.p.) injection, did not result in any observable fear response in WT mice (time spent immobile still <25%). In contrast, scruff restraint induced a large increase in tonic immobility in *mdx* mice (>80%) characterized by a lasting freezing-like behavior (genotype effect: $F_{1,20} = 275.4$, $P < 0.0001$). Only short distance travelled and short episodes of mobility were observed in *mdx* mice over the 5-min testing period. When performed in younger (3-months old) mice, scruff restraint also resulted in high levels of freezing in *mdx* but not in WT mice (Fig. 1A; $F_{1,26} = 312.3$, $P < 0.0001$), indicating that duration of disease does not potentiate fear responses. In a second experiment, we showed that scruff restraint induced a rapid increase in adrenocorticotrophic hormone (ACTH) circulating levels in both genotypes (blood samples taken <2 min after restraint) as compared with the baseline levels measured in home-cage controls ($F_{1,1} = 21.9$, $P < 0.001$; Fig. 1B). Although the basal level of ACTH was lower in the mutants (Home-cage condition; $P < 0.05$), the global effect of restraint on ACTH levels was comparable among genotypes (Genotype effect: $F_{1,1} = 0.3$, $P > 0.5$; genotype x condition: $F_{1,18} = 1.6$, $P > 0.2$) with similar levels of circulating ACTH in both genotypes after restraint. Scruff restraint is an acute stress regulator of ACTH production, and because intensity of stressful stimuli and magnitude of the adrenal response are considered to be correlated (22), the results suggest that mice from both genotypes underwent comparable stress.

We then tested the possibility that tilting the animals during restraint could have been a main stressful stimulus, since in Japanese quails the restraint procedure used to induce tonic immobility only consists in tilting the animal on its back (23). However, we found that restraining *mdx* mice by grasping the scruff without tilting their body upside-down ("scruff-not tilted" condition) induced comparable levels of freezing as with the initial scruff-restraint procedure (>75%; Fig. 1C). When restraint consisted in placing mice individually in a narrow tube (3 cm in diameter) for 5 min, the freezing levels in *mdx* mice were lower than in the standard scruff-restraint condition (62%; $P < 0.05$; Fig. 1C, "tube" condition), suggesting that freezing amount varied depending on intensity of stressful events.

We then determined whether unconditioned fear responses could be modulated by repetition of the stressful stimuli. When scruff restraint was applied once a day during 6 days (Fig. 1D), the freezing response remained enhanced and stable in *mdx* mice (Genotype effect: $F_{1,9} = 120.9$, $P < 0.0001$; trial effect in *mdx* group: $F_{5,25} = 0.6$, $P > 0.6$; NS), indicating strong resistance to extinction of this behavior. In contrast, WT mice initially displayed a very low level of immobility (<10%), which progressively increased to ~35% (Trial effect: $F_{5,20} = 5.8$, $P < 0.01$), reflecting a typical decrease in their motivation for repetitive exploration. In another group of naïve *mdx* mice repetition of the stress procedure was applied in 18 trials within the same day (Fig. 1E). During the first block of six trials, the percent freezing increased from ~78% up to ~94%, reflecting a potentiation of the fear response. Then, the percent freezing decreased across next trials ($F_{17,102} = 24.3$, $P < 0.0001$), indicating that

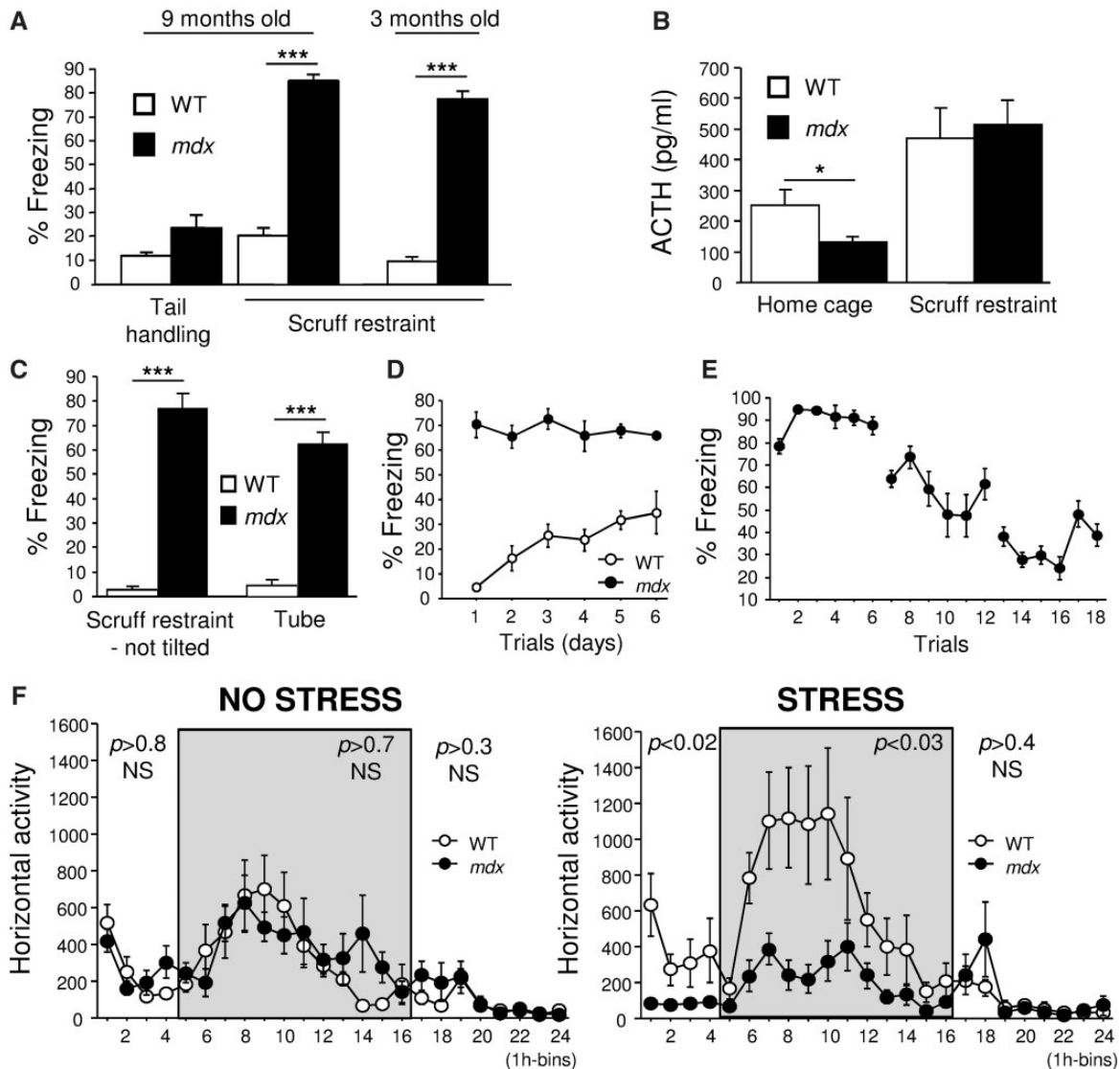


Figure 1. Fear-related tonic immobility. (A) Percent freezing in 5 min following gentle tail handling or brief scruff restraint (15 s) in 9-month-old (WT, $n = 10$; *mdx*, $n = 12$) and 3-month-old mice ($n = 14$ per genotype). (B) Plasma ACTH levels in home-cage control mice ($n = 6$ per genotype) and in mice submitted to scruff restraint ($n = 5$ per genotype). (C) Percent freezing when restraint was applied by grasping the scruff without tilting upside-down animal's body ("scruff restraint—not tilted"; 5 WT and 7 *mdx*) or by placing individual mice in a transparent cylinder 3 cm in diameter ("tube"; 2 WT and 7 *mdx*). (D) Percent freezing following scruff-restraint in trials repeated once a day during 6 days (5 WT and 6 *mdx*). (E) Percent freezing in a group of 7 *mdx* mice when scruff restraint was applied in 18 trials distributed within the same day in 3 blocks of 6 trials (20-min ITI; 90-min interval between blocks). * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$. (F) Circadian modulation of spontaneous horizontal locomotor activity, evaluated from the number of consecutive beam breaks per 1 h bin during 24 h, following gentle tail-handling introduction of the mice in the actimeter (NO STRESS; $n = 12$ per genotype) or after scruff restraint (STRESS; $n = 8$ per genotype). Grey rectangles represent the 12 h periods of darkness; probabilities at the top show the genotype effects during the light and dark phases. Circadian modulation of vertical activity shown in [Supplementary Material, Figure S1](#).

extinction may occur with extensive repetition of the stressful stimulus. This was associated with struggling attempts during restraint and slight renewal of vertical activity.

Enhanced fearfulness induces lasting motor inhibition

The lasting impact of fearfulness on mouse motor activity was addressed by comparing the circadian modulation of spontaneous locomotor activity following gentle handling (No stress condition) and scruff restraint (Stress condition). As shown in [Figure 1F](#), the absence of prior stress resulted in comparable spontaneous horizontal activity in both genotypes over a 24 h cycle. A typical circadian rhythmicity was observed in both WT and *mdx* mice: Activity was increased during the first hour that

followed handling and larger increases were further observed during the dark phase of the cycle. In marked contrast, the scruff-restraint stress, performed just before releasing the mice in actimeter cages, induced a strong and lasting motor inhibition in *mdx* mice. It is worth to note that horizontal activity was at a very low level in *mdx* mice during the first 5 h following stress, as compared to control mice. During the dark phase, locomotion in WT mice was globally higher in this stress condition as compared to the no stress condition. In *mdx* mice, the onset of darkness induced a renewal of mobility but their activity remained largely below WT levels throughout the dark phase. Comparable levels of activity between genotypes were only observed after > 12 h. The temporal distribution of vertical activity followed a comparable, yet more variable, time course

(Supplementary Material, Fig. S1): Vertical activity was comparable in unstressed WT and *mdx* mice, while it was largely smaller in *mdx* mice compared to WT mice in the stress condition. The data suggest long-lasting effects of fearfulness on *mdx* mice mobility but preserved circadian modulation of spontaneous locomotor activity.

Relationships among motor, emotional and cognitive performance

The young mice (3 months old) tested for unconditioned tonic immobility in Figure 1A were further submitted to a behavioral test battery aimed at evaluating putative dependence among behavioral variables measuring motor, emotional and memory performance. The inverted grid test (Fig. 2A) confirmed that *mdx* mice fail to maintain a grip onto a grid placed upside down, which is believed to result from their inability to support their own body by grasping the grid due to muscle weakness (24). Their fall latencies were consistently shorter than in WT mice across successive trials ($F_{1,26} = 14.7, P < 0.001$). Locomotion and exploration of a novel environment (open-field test) were also drastically reduced in *mdx* mice (Fig. 2B and C): The distance travelled was constantly reduced by ~40% in *mdx* as compared to WT mice over the 30-min recording period ($F_{1,26} = 15.7, P < 0.001$; Fig. 2B) and the maximal speed shown by *mdx* mice during bouts of locomotor activity was also reduced ($P < 0.01$; Supplementary Material, Fig. S2A). Exploration of the center zone of the open field (OF), typically considered as an anxiety-related behavioral parameter, was lower in *mdx* compared to WT mice (Fig. 2C): *Mdx* mice displayed an increased latency to enter the center zone ($F_{1,26} = 4.4, P < 0.05$; Fig. 2C), a reduced number of entries into this zone ($F_{1,26} = 9.2, P < 0.01$; Fig. 2C) and the percent distance travelled in the center zone was also significantly reduced during the first 15 min of testing ($F_{1,26} = 4.9, P < 0.05$; Supplementary Material, Fig. S2B), suggesting a higher level of anxiety in the mutants.

Behavioral despair, typically characterized by episodes of immobility (freezing) in response to unescapable stressful situations, was assessed using two rodent models of depression, the tail-suspension test (TST) and the forced swimming test (FST). In both tests, mice initially engaged vigorous movements to escape from the stressful situation and then showed freezing episodes of increasing duration after a few minutes. A typical two-session procedure with a 24h interval was used to induce a high and stable level of immobility. In both TST (Supplementary Material, Fig. S2C) and FST (Supplementary Material, Fig. S2D), the latency and duration of freezing were comparable between genotypes during each session, reflecting comparable motivation and active reactivity to stress in the two genotypes. The second testing session was characterized by decreased latencies and increased durations of freezing, reflecting learning of the unescapable nature of this aversive situation. In the FST, the ability to stay afloat was reduced in *mdx* compared to WT mice ($F_{1,26} = 8, p < 0.01$), while the time spent climbing (repetitive striking of the glass walls with forepaws) was longer in *mdx* mice ($F_{1,26} = 6.7, p < 0.05$; Fig. 2D). However, these two parameters did not show main variations within each genotype between the two sessions, suggesting that they reflected motor skills rather than behavioral despair or learning, as believed by others (25,26).

Fear memory was evaluated in a single-trial contextual fear conditioning paradigm. During familiarization to the testing box (habituation), motor activity was reduced in *mdx* mice

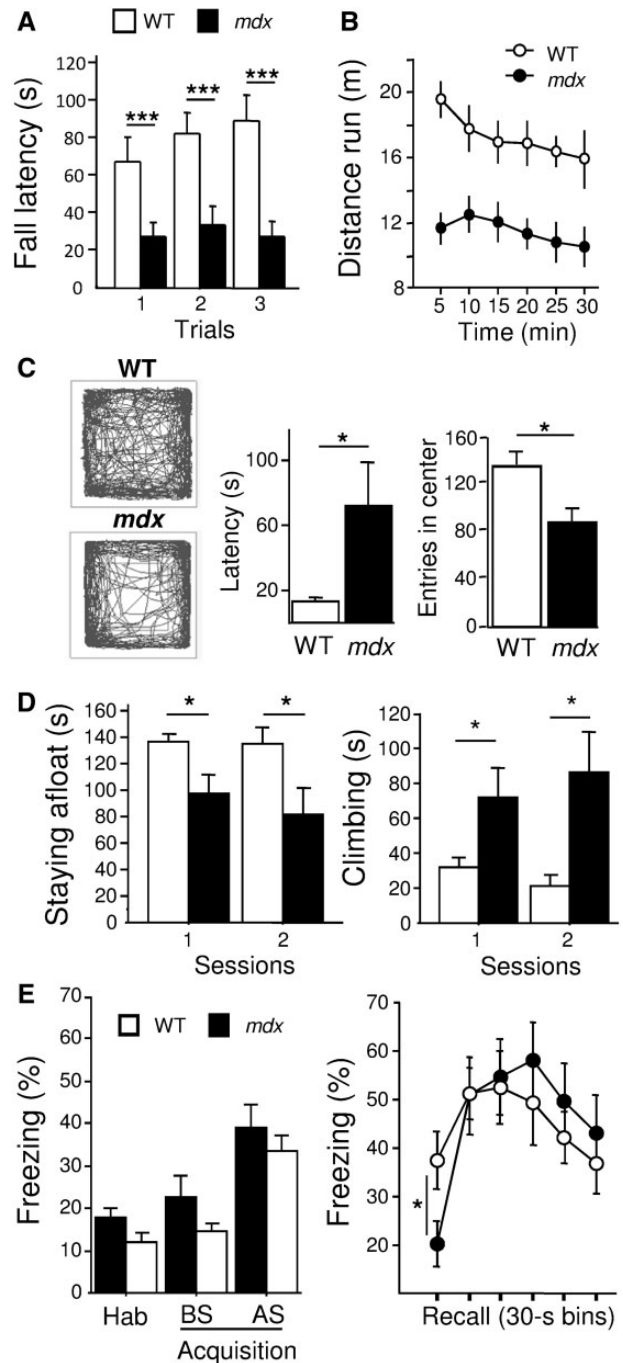


Figure 2. Motor, emotional and memory performance in a longitudinal behavioral study. (A) Muscle strength evaluated by fall latencies in mice placed upside-down on an inverted grid across three successive trials. (B) Ambulation in the OF for 30 min, expressed as distance travelled by 5-min bins. (C) Two representative track plots on the left show exploration paths cumulated over the 30-min recording period in the OF, with an overt reduction of exploration of the center zone in *mdx* mice. The following plots show the latency of the first entry (s) and the total number of entries in the center zone. (D) Time spent staying afloat (s) and time spent climbing (s) during the two sessions of the FST. (E) Single-trial contextual fear conditioning. The bar plot shows the percent freezing recorded during the habituation (Hab) and acquisition sessions (BS and AS: before and after shock delivery, respectively). The line plot shows the percent freezing expressed in 30-s bins during the first 3 min of the retention session performed 24 h later. All tests, $n = 14$ per genotype. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$. Supporting data in Supplementary Material, Figure S2.

compared to WT, as evidenced by analysis of the distance travelled ($P < 0.001$), maximal speed ($P < 0.0001$) and vertical activity ($P < 0.001$). Slight hypoactivity was also present in *mdx* mice before shock delivery during the acquisition session. Delivery of a single electric shock during the acquisition session was associated with increased freezing in both genotypes (Fig. 2E, left panel) and there was no more genotype effect in all activity parameters, suggesting comparable acquisition in the two groups of mice. On the following day, mice placed in the same context expressed fear responses (freezing) reflecting retention of contextual fear memory (Fig. 2E, right panel). However, the quantity of freezing expressed during the first 30 s was significantly lower in *mdx* than in WT mice ($P < 0.05$), suggesting a delayed recall of contextual fear memory. Moreover, when freezing behavior was normalized to basal immobility recorded during habituation (21), then the genotype difference in fear memory performance was significant throughout the 5-min testing period ($F_{1,26} = 6.3$, $P < 0.02$; not shown). Impaired performance could not be attributed to overt changes in the behavioral expression of the fear response, as excessive running, jumping, or motor stereotypies were not observed during this retention session.

To evaluate putative relationships among the diverse behavioral disturbances displayed by *mdx* mice, we selected seven main variables that enabled identification of significant genotype effects in this longitudinal study and performed a multivariate factor analysis to highlight interrelated variables in each genotype (Table 1). The principal component method enabled extraction of three factors with eigenvalues > 1 , which together explained $> 75\%$ of the total variance in each genotype (*mdx*: 87%; WT: 77.2%). Each factor was represented by a linear combination of a relatively independent subset of highly correlated variables (27). Interpretation of each factor was based on the identification of the variables that highly correlated with this factor but not with the other extracted factors. In *mdx* mice, the first factor, which explained the largest amount of group's variance (38%), was characterized by a high and inverse correlation between variables representing either exploration or fearfulness. This likely reflects a strong relationship between the enhanced fearfulness and reduced exploratory activity during open-field testing in *mdx* mice. Factor 2 was characterized by a coherent subset of variables related to motor function, highlighting that large amounts of climbing behavior correlated with short time spent floating in the FST and short fall latencies in the inverted grid test. This confirms that the genotype effects revealed in the FST reflect a motor impairment rather than altered behavioral despair. Interestingly, variables associated with motor functions only correlated with factor 2 whilst fear memory performance correlated with factor 3. Overall, this suggests that reduced exploration and locomotion in the OF were mainly influenced by fear reactivity, while the other motor and cognitive deficits in this mutant were relatively independent from emotional disturbances. Distinct variable interdependencies were found in WT mice. First, there was no relationship between exploratory behavior and fear reactivity, as the related variables were highly correlated to independent factors (Factor 1 and 3, respectively). Second, fear memory performance was partially correlated to factor 2 and 3, suggesting that both motor performance and stress reactivity influenced the level of freezing upon memory recall in the fear conditioning task in WT mice. This further suggests that the functional relationships linking motor, emotional and cognitive functions in *mdx* mice were disorganized.

Anxiety-related behavior and aversive cue-outcome associative learning

We further evaluated the presence of anxiety-related responses in independent groups of WT and *mdx* mice in standard anxiety tests. In the light-dark box test, mice had the choice to explore a brightly lit anxiogenic compartment or to stay in a more secure dark compartment. As shown in Figure 3A, the time spent in the lit compartment was shorter in *mdx* mice compared to WT mice ($F_{1,30} = 10.4$, $P < 0.01$), suggesting a higher level of anxiety in the mutants. In contrast, no main genotype difference was detected in the elevated plus-maze test, in which anxiety results from the threat induced by void in elevated open arms (Fig. 3B). The number of entries and time spent in open arms were comparable between genotypes ($P > 0.4$; NS). Moreover, both genotype performed a comparable number of head dips at exit of closed arms (Protected head dips; $F_{1,15} = 0.5$, $P > 0.4$; NS) and during exploration of open arms (Unprotected head dips; $F_{1,15} = 0.7$, $P > 0.4$; NS), indicating that risk assessment behavior was unaltered in *mdx* mice.

Aversive cue-outcome associative learning was studied in auditory-cued fear conditioning and conditioned taste aversion. Mice were gently handled every day for a week before being submitted to tasks, in order to avoid any stress before testing. As shown in Fig. 3C, acquisition of fear conditioning was significantly delayed in *mdx* mice ($F_{1,29} = 5.6$, $P < 0.03$), whereas freezing amount during inter-trial intervals (after footshock delivery) was comparable in the two genotypes ($F_{1,29} = 1.4$, $p > 0.2$; not shown), suggesting a specific deficit in learning the predictive value of the conditioned stimulus (CS) (tone). Recall of fear memory 24 h post-acquisition was also strongly delayed in *mdx* mice, as shown by the small amount of freezing induced by the delivery of the CS alone during the retention session ($F_{1,29} = 9.1$, $P < 0.01$). In contrast, no genotype difference was detected in conditioned taste aversion. For this test, the mice were maintained for 3 days under a water-restriction regimen before conditioning started; mice in both genotypes displayed comparable body-weight loss (*mdx*: $10.8 \pm 0.4\%$; WT: $10.6 \pm 0.3\%$; $F_{1,21} = 0.04$, $P > 0.8$) and total water intake (*mdx*: 1.7 ± 0.08 ml; WT: 1.6 ± 0.06 ml; $F_{1,21} = 0.9$, $P > 0.3$). During the acquisition session, comparable sucrose intake was quantified in the two genotypes (*mdx*: 1.3 ± 0.07 ml; WT: 1.2 ± 0.1 ml; $F_{1,21} = 1$, $P > 0.3$). During the retention session (Fig. 3D), i.e. 24 h after sucrose consumption had been paired with LiCl-induced nausea, both *mdx* and WT mice consumed less of the sucrose solution as compared to unconditioned controls injected with NaCl (Genotype effect: $F_{1,19} = 0.3$, $P > 0.5$; treatment: $F_{1,19} = 29.8$, $P < 0.0001$, genotype \times treatment interaction: $F_{1,19} = 1.5$, $P > 0.2$). This other form of long-term associative memory therefore appeared to be unimpaired in *mdx* mice.

Behavioral effects of the extrasynaptic GABA_A-receptor agonist, THIP

4,5,6,7-Tetrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridin-3-ol hydrochlorid (THIP), also called Gaboxadol, is a selective activator of extrasynaptic δ -subunit-containing GABA_A receptors, which can induce a range of dose-dependent anxiogenic, sedative/ataxic and hypnotic effects following i.p. injection (28–30). We first investigated the effects of two doses of THIP (3 and 10 mg/kg) on exploratory activity in the OF, 30 min post-injection. Saline control as well as THIP-injected *mdx* mice were less active than WT mice receiving comparable treatments in this test, as shown by decreased distance travelled and decreased ambulation speed

Table 1. Relationships among motor, emotional and memory performance. In each genotype ($n = 14$ per genotype), seven variables that revealed significant genotype effects in the behavioral test battery were used: the percent time spent in tonic immobility following scruff restraint (Fearfulness), the total distance travelled and the number of entries in the center zone in the open-field test (OF distance; OF center entries), the fall latency in the inverted grid test (Grid fall latency), the time spent staying afloat and climbing in the FST (Staying afloat; Climbing) and the percent freezing during the first 30-s bin during the retention session of contextual fear conditioning (Fear memory). The seven variables were reduced to three extracted factors in each genotype. For each factor, the eigenvalue (EV) and percent of total variance explained by the factor are shown at the top of the columns. Interpretation of each factor is indicated below the variance values, based on the correlation of the seven variables on this factor. Strong correlation of a variable (>0.75) with only one of the three factors is highlighted in grey. Correlations comprised between 0.5 and 0.75 are underlined. Note the strong inverse correlation between fearfulness and OF exploration parameters in *mdx*, but not in WT mice (Factor 1), while other motor parameters (grid fall latency, staying afloat and climbing) and memory performance independently correlated with factors 2 and/or 3 in both genotypes.

Behavioral variables	MDX			WT		
	Factor 1 EV = 2.67 38.3%	Factor 2 EV = 2.29 32.7%	Factor 3 EV = 1.11 16%	Factor 1 EV = 2.84 40.6%	Factor 2 EV = 1.53 21.9%	Factor 3 EV = 1.027 14.7%
	Exploration and Fear	Motor function	Memory	Exploration	Motor function	Fear
Fearfulness	-0.851	-0.268	0.143	-0.009	-0.082	0.931
OF distance	0.837	-0.092	0.376	0.920	-0.239	-0.064
OF center entries	0.976	0.053	0.092	0.911	0.059	0.024
Grid fall latency	0.185	0.779	-0.278	-0.405	0.621	0.344
Staying afloat	0.079	0.927	0.113	-0.110	-0.898	0.016
Climbing	0.158	-0.931	-0.181	-0.461	0.795	-0.075
Fear memory	0.138	0.066	0.956	-0.010	0.577	-0.339

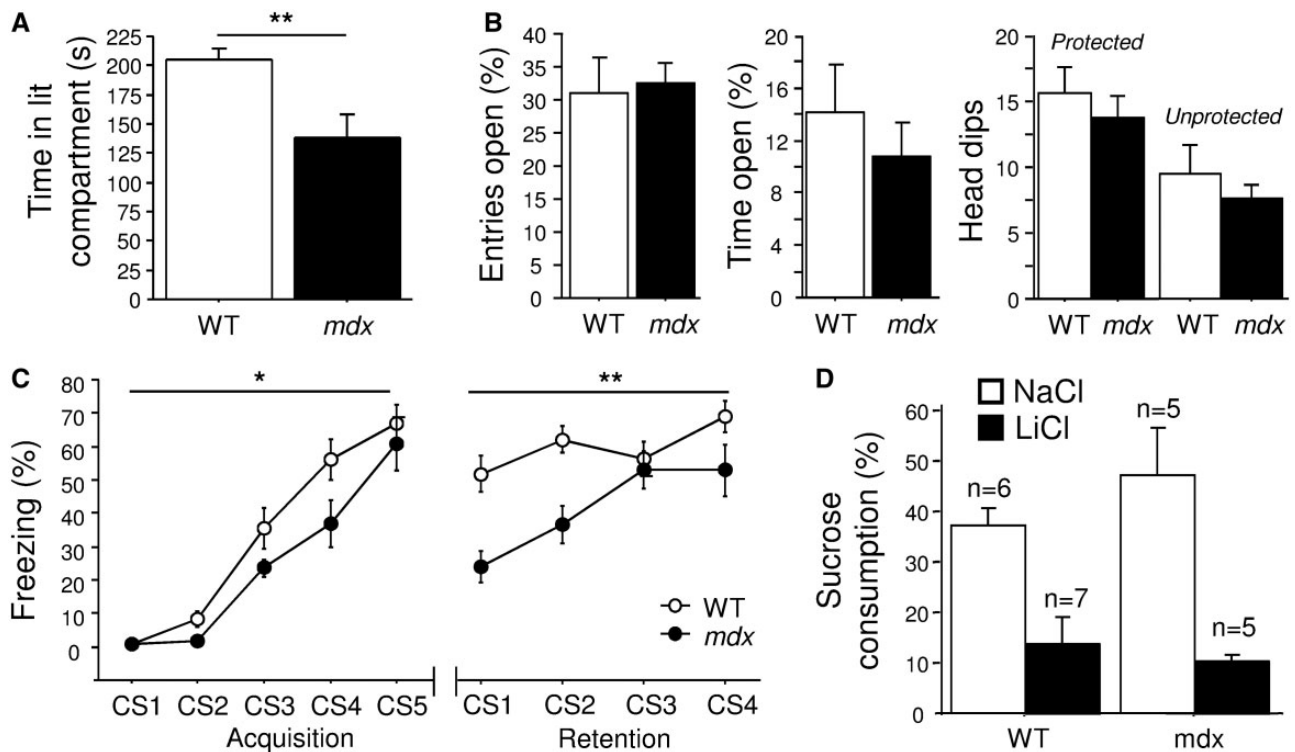


Figure 3. Anxiety and aversive learning. (A) Time spent in the lit compartment in the light-dark test (WT, $n = 18$; *mdx*, $n = 14$). (B) Behavioral responses in the elevated plus-maze test expressed as the percent number of entries and percent time spent in the open arms and by the number of protected and unprotected head dips (WT, $n = 8$; *mdx*, $n = 9$). (C) Auditory-cued fear conditioning (WT, $n = 18$; *mdx*, $n = 13$). Percent freezing was recorded during presentation of the conditioned stimulus (tone, 30s) during acquisition (CS1-5 each followed by one footshock as the US) and during retention (CS1-4 not followed by US). (D) Conditioned taste aversion. Percent sucrose intake (sucrose/sucrose + plain water) during the choice test, 24 h after pairing sucrose with either LiCl or NaCl injections. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

in all *mdx* subgroups (Fig. 4A and B, respectively; $P < 0.001$). There was a trend in THIP-treated *mdx* mice, but not in WT mice, to display dose-dependent decreases for these motor parameters. However, this apparent difference between genotypes

was not significant (drug \times genotype interaction: NS). Both doses of THIP only induced a slight reduction in vertical activity in WT mice (Fig. 4C). In contrast, 10 mg/kg THIP induced a drastic decrease in vertical activity in *mdx* mice, but not in WT mice

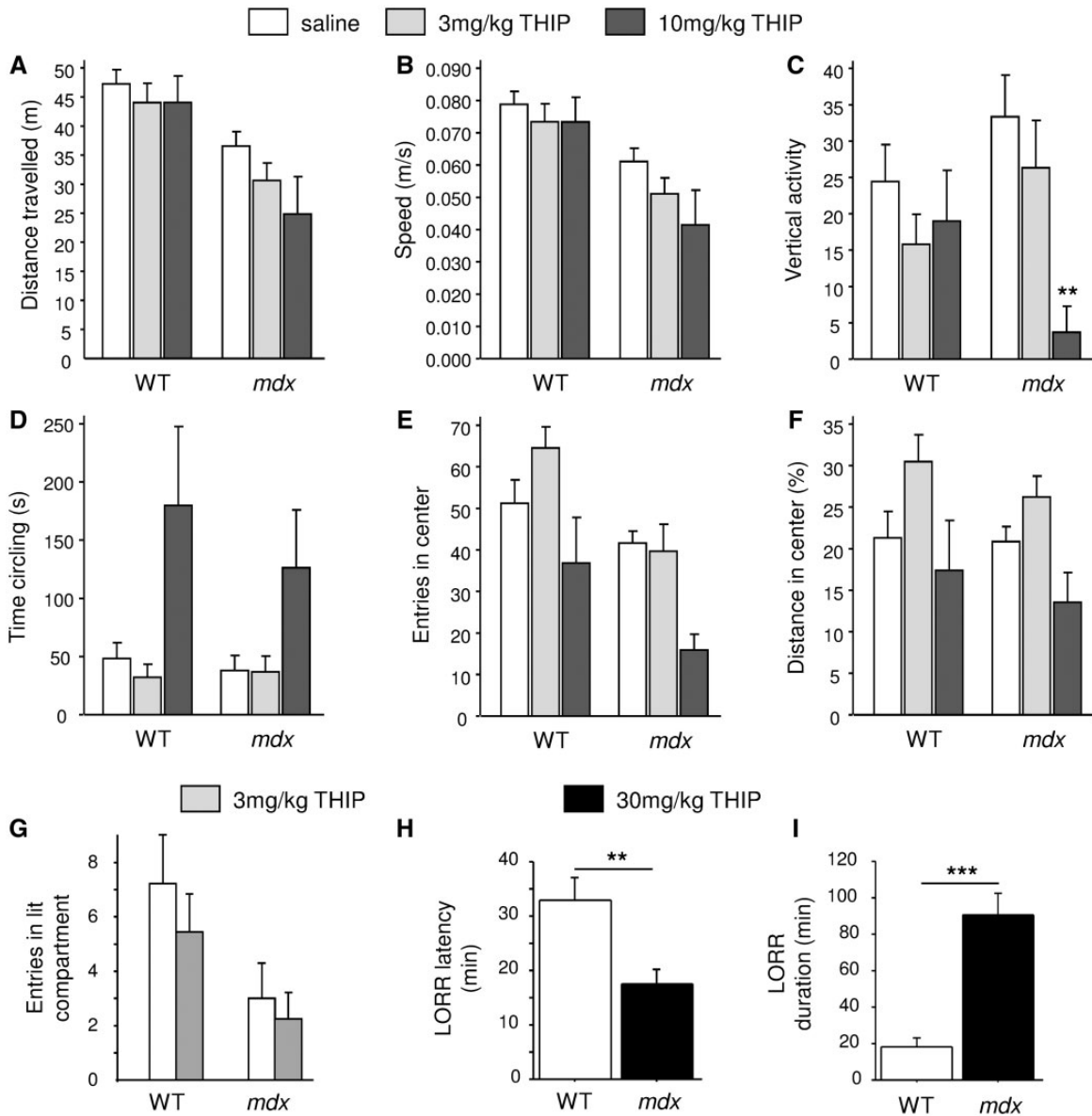


Figure 4. Behavioral responsiveness to the extrasynaptic GABA_A-receptor agonist, THIP. (A–F) Effects of THIP administration on WT and *mdx* mouse behavior during OF exploration for 10 min ($n = 9$ per treatment group in each genotype). Several behavioral parameters were analyzed in THIP-injected (3 mg/kg; 10mg/kg) and saline-injected mice of both genotype: (A) distance travelled, (B) travelling speed, (C) vertical activity, (D) time spent circling along walls, (E) Number of entries in the center area, (F) percent distance travelled in the center area. The main genotype difference (** $P < 0.01$ in C) was the drastic reduction of vertical activity observed in *mdx* mice, but not in WT mice, following administration of 10 mg/kg THIP. (G) Number of entries in the lit compartment during light-dark choice testing. (H) and (I) Hypnotic effect of 30 mg/kg THIP administration (WT, $n = 8$; *mdx*, $n = 10$) characterized by loss of the righting reflex (LORR) and expressed as LORR latency (H) and LORR duration (I). Genotype differences: ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

(Fig. 4C; THIP effect: $P < 0.01$; genotype \times drug interaction: $P < 0.05$; saline versus 10 mg/kg THIP in *mdx* mice: $P < 0.01$, Bonferroni post-hoc test), suggesting that *mdx* mice have an increased sensitivity to this dose of THIP that usually mediates sedative effects in mice. This 10 mg/kg dose of THIP also induced a significant increase in the time spent in stereotypic-like circling along walls in both genotypes (Fig. 4D; drug effect: $P < 0.01$; Drug \times Genotype interaction: $P > 0.5$; NS; 10 mg/kg THIP versus saline or 3 mg/kg THIP: $p < 0.01$). The number of entries in the center area of the OF was reduced in *mdx* compared to WT mice (Fig. 4E, genotype effect: $P < 0.001$). There was a significant effect of THIP on this parameter ($P < 0.001$), but no significant genotype \times drug interaction ($P > 0.4$; NS), and

the relative distance travelled in the center area was statistically comparable between genotypes (Fig. 4F; drug effect: $P < 0.01$; genotype \times drug interaction: $P > 0.8$; NS). In the light-dark choice paradigm, control *mdx* mice had longer latencies to enter the lit compartment ($P < 0.01$) and made less entries in this area (Fig. 4G; $P < 0.05$), thus confirming enhanced anxiety in this mutant. No main effect of 3 mg/kg THIP was found in this test, confirming that this lowest dose of THIP does not significantly alter *mdx* mouse behavior. Finally, the hypnotic effect of a higher dose of THIP (30 mg/kg) was evaluated by quantification of the latency and duration of the loss of the righting reflex (LORR), defined as the lost capacity to right oneself when being placed in a supine position. The LORR latency was very short in

mdx as compared to WT mice (Fig. 4H), while the LORR duration was drastically increased in *mdx* mice (> 4-fold increase; Fig. 4I), thus reflecting a strongly delayed righting reflex recovery in the mutants. In all, *mdx* mice showed a higher responsiveness to THIP at doses which usually induce sedative (10 mg/kg) and hypnotic (30 mg/kg) effects in mice.

Discussion

In the present study, we have further characterized the determinants of the enhanced fearfulness displayed by dystrophin-deficient *mdx* mice in response to mild acute stress and we deciphered its potential impact on motor, emotional and cognitive performance. Moreover, we provide the first evidence that *mdx* mice have an enhanced sensitivity to the behavioral effects induced by a selective agonist of extrasynaptic GABA_A receptors, suggesting that a defect in central tonic inhibition might contribute to the behavioral disturbances associated with DMD.

Determinants of enhanced fearfulness

The potent freezing response in *mdx* mice, expressed as lasting tonic immobility, is reminiscent of the natural defensive death-feigning posture that animals normally enter when confronted to a predator or other extreme threat, which is believed to involve a brain circuit that includes the amygdala (1,31). The precise brain mechanisms responsible for this phenotype remain to be fully elucidated, but the present study constitutes an important step forward to better understand the bases of this abnormal behavior. Here, we show that the enhanced fearfulness displayed by dystrophin-deficient *mdx* mice is robust and resistant to extinction, as it can be stably induced and repeatedly expressed over days. This phenotype might therefore constitute a main readout for longitudinal studies assessing the dynamics of therapeutic agents targeting brain dysfunctions in this model of DMD. Here, we have used singly-housed mice that we have released in novel environments following scruff restraint stress. However, it is likely that group-housed mice released in a familiar environment may express reduced fear responses, as suggested by one study showing that the presence of familiar olfactory cues in the cage reduces the amount of freezing in stressed *mdx* mice (32).

It seems unlikely that a peripheral dysfunction contributes to the expression of fearfulness in *mdx* mice. Indeed, the magnitude of the fear response does not increase as a function of disease duration from 3 to 9 months of age, and a substantial extinction of the fear response can occur if presentation of the stressful event is extensively repeated within a single day, which does not seem compatible with a cardiac defect. Accordingly, severe cardiomyopathy has only been reported in *mdx* mice older than 18 months (33,34) or in the specific *mdx*^{4cv} model of cardiomyopathy (35). Performing restraint stress without tilting animal's body did not reduce the amplitude of the fear response, which rules out contribution of a vestibular defect. A greater pain sensitivity is also unlikely, as freezing was also observed after a short stay in a tube restrainer and changes in nociception were not detected in *mdx* mice in a footshock threshold test (36). *Mdx* mice did not show any characteristic features of spontaneous catalepsy during tonic immobility, such as rigidity of the extremities or maintenance of a position of the body forced by the experimenter (37), and we verified that sudden noises or touching the animal could interrupt freezing and induce motion.

We further addressed the possibility that neophobia or depressive-like behaviors could contribute to enhanced fearfulness in *mdx* mice (38). However, unstressed *mdx* mice showed normal exploratory activity in a novel environment (actimeter) and the behavioral responses induced by unescapable stressful situations (attempts to escape, despair) were comparable in adult *mdx* and WT littermate mice in both TST and FST, two standard tests used in depression studies in mice models (39,40). Therefore, enhanced fearfulness could not be attributed to a main alteration of the processes involved in active reactivity to stress or of a motivational component of emotionality. We also quantified the levels of the circulating adrenocorticotrophic stress hormone (ACTH) in home cage and after scruff restraint. Home-cage levels of ACTH measured close to the time of circadian nadir were lower in *mdx* compared to WT mice, suggesting a slight alteration of the passive (glucocorticoid degradation) or active processes (feedback inhibition) that terminate hypothalamo-pituitary-adrenocortical responses following stressor suppression (41). However, a large rise in ACTH level was induced by scruff restraint and comparable net levels were detected in both genotypes, suggesting that they underwent comparable stress responses, in line with the comparable levels of corticosteroids detected by others following the same protocol (32).

The enhanced fearfulness in *mdx* mice likely reflects a maladaptive coping strategy, as maturational and environmental factors normally favor progressive decrease of such unconditioned responses. Often considered as an innate behavior, unconditioned fear is also viewed as a cognitive process since it involves evaluation of emotional valence, representations, attention and arousal, and outcome predictions that enable anticipatory, coordinated and dynamic response to fearful stimuli (42). Our results support the hypothesis that dystrophin loss alters the amygdala-dependent processing of threat cues (1) or, more largely, the functional integrity of the brain fear circuit that normally regulates fear responses and fear-related motor behavior (42–44).

Impact on motor functions

Importantly, we found that enhanced fearfulness may have a strong and long-lasting impact on locomotion and exploratory activity in *mdx* mice. Indeed, we demonstrate that the strong stress-induced motor inhibition in *mdx* mice may last several hours after termination of the restraint when mice are immediately placed in a novel environment (actimeter). Even though circadian rhythmicity was preserved and a renewal of mobility was induced following onset of the dark phase in the actimeter, both horizontal (ambulation) and vertical (rearing, leaning) activities were strongly reduced in *mdx* mice compared to WT mice for about 12 h. In contrast, locomotion and vertical activity were comparable in the two genotypes in the absence of prior stress. Such a long-lasting effect of restraint stress has also been observed in Japanese quails in which a significant association of the *dmd* gene with tonic immobility was determined (2). In our longitudinal study, in which mice were submitted to a behavioral test battery starting with a scruff restraint episode, we also observed a drastic reduction in mobility during exploration of an OF, even though this test was performed five days after restraint. Reduced ambulation of *mdx* mice during open-field testing has been previously reported (45), but this is at variance with the normal locomotion observed in naïve *mdx* mice released in a novel cage or OF without prior stress, such as

shown here in the actimeter or in previous open-field studies undertaken by other research groups (1,38). Our results suggest that any period of restraint may have a long-lasting effect on exploratory behavior and ambulation in *mdx* mice, yet differences in housing, handling and experimental conditions could explain variability among laboratories (32).

Our longitudinal study revealed a strong inverse correlation between stress-induced freezing and global locomotor activity during open-field testing (Table 1), thus confirming the relationship between exploratory behavior and prior stress experience in our conditions. In contrast, other motor parameters reflecting poor muscle strength and/or motor incoordination, such as climbing behavior and capacity to stay afloat in the forced swim test, or the fall latency in the inverted grid test, did not correlate with enhanced fearfulness. Hence, acute stress in *mdx* mice has a lasting inhibitory effect on exploration and locomotion in novel environments (cage, actimeter, OF), but not on other outcome of motor function tests related to muscle strength and motor coordination. Poor mobility in these mice, sometimes attributed to extreme fatigue due to muscle wasting (24), should therefore be interpreted with caution as it may in part result from enhanced stress reactivity. Scruff restraint is a routinely used method in animal facilities to verify mouse identification and for intra-peritoneal injections. We demonstrate here that this apparently mild stress associated with routine mouse handling may have profound and confounding effects on locomotion parameters that are often used to assess treatment effects in preclinical studies using the *mdx* mouse model.

Impaired fear learning and memory

In Pavlovian fear conditioning, good memory performance is characterized by rapid occurrence and long duration of freezing responses that reflect associations between aversive stimuli and predictive cues. A chronic enhancement of emotional arousal may result in a bias for threat cues and facilitation of fear learning and memory, as in mouse models with disrupted clustering of GABA_A receptors (46). However, despite the reduced GABA_A-receptor clustering and high fear reactivity reported in the *mdx* mouse, this model rather displays performance deficits in several amygdala-dependent fear-learning paradigms (21,36). Freezing responses upon recall of fear memories are reduced in *mdx* mice compared to WT mice, whether animal's motion and freezing responses are quantified by video-tracking methods or using a weight transducer system. Analyses of different behavioral parameters did not reveal any clue that fear could be expressed through different behavioral responses in *mdx* mice. A pronounced impairment was found during auditory-cued fear conditioning, in which association of fear with a predictive auditory stimulus requires an intact amygdala (47). In contrast, long-term memory of a conditioned taste aversion was unimpaired, suggesting that only a subset of amygdala-dependent aversive-outcome associative processes are affected by dystrophin loss (48,49). The recall of contextual fear memory was also impaired in *mdx* mice. This performance, recorded in a longitudinal study, did not correlate with the tonic immobility recorded in the scruff-restraint test, suggesting that these two phenotypes relied on separate mechanisms. This is in agreement with current neurobehavioral models highlighting that distinct nuclei and subnuclei within the amygdala, as well as connections to different subcortical structures and specific cellular and signaling mechanisms, differentially contribute to

unconditioned fear and to different forms of fear memory (42,50).

Because memory deficits are detected in *mdx* mice even in tasks for which good performance is normally reflected by heightened immobility, they likely result from the formation of inappropriate fear associations and/or alterations of consolidation processes, as suggested earlier (36). Hippocampal function is altered in *mdx* mice (51,52) and it is worth to note that the hippocampus is also engaged with amygdala during contextual fear conditioning (53,54), as well as in the modulation of fear-related motor behavior (43). A recent study using cell-specific conditional knockouts of the GABA_A receptor $\alpha 2$ subunit in distinct hippocampal subfields unveiled that a specific microcircuit in the CA1 subfield takes part in the expression of fear responses (55). It is thus likely that dystrophin loss, which has been associated with impaired clustering of α subunit-containing GABA_A receptors in various cortical and subcortical structures, may elicit variable alterations in distinct amygdala nuclei as well as in connected structures involved in the circuits of fear, anxiety and emotional learning, giving rise to the complex phenotypes characterized herein.

Anxiety-related behaviors

Higher reactivity to acute stress may be associated with alterations in other aspects of emotionality such as anxiety (56,57). Here, *mdx* mice showed a reduction of exploration of the central zone of an OF, an indication of enhanced anxiety (21,38), and a higher level of anxiety in a light-dark choice anxiety test. As reported by others (1), however, mice of both genotypes displayed comparable performance and risk assessment strategies in the elevated plus maze test. The cause of these discrepancies observed among distinct anxiety tests remains unclear but cannot be attributed to differences in the motor demand, as enhanced anxiety-related responses were observed in both low- (light-dark choice) and high-motor demand tests (OF exploration), but not in the elevated plus maze which also involves a high-motor demand. The nature or strength of the anxiogenic stimulus could be a possible factor modulating emotional reactivity in *mdx* mice, as well as the different novelty-seeking motivation and attention states associated with distinct experimental situations. Anxiety is a complex phenomenon that cannot be described in a single test and several studies demonstrated that the effects of anxiolytic compounds may greatly vary depending on the targeted neurotransmission system, mouse genetic background and experimental conditions (58). Although an alteration of amygdala GABAergic circuits remains a major hypothesis to explain emotional disturbances in *mdx* mice, additional alterations of central serotonin (38,59,60) and cholinergic functions (61) might also induce specific modulations of anxiety-related behaviors in distinct testing conditions (62,63).

What role for extrasynaptic GABA_A receptors?

In *mdx* mice, the number of α subunit-containing postsynaptic GABA_A-receptor clusters is reduced by ~50% in central inhibitory synapses of hippocampus, amygdala and cerebellum. Consequently, a reduction in GABAergic inhibition has been reported in these structures (1,17,20,64) and associated with altered synaptic plasticity (52,65–67). In the basolateral amygdala of *mdx* mice, norepinephrine (NE)-induced GABAergic transmission is reduced (1). As NE is normally released in

response to stressful stimuli such as restraint and footshocks, this alteration in *mdx* mice might perturb the control of neuronal excitability in this structure and inappropriately modulate the brain aversion system and neuronal circuits involved in unconditioned and conditioned fear.

The reduced clustering of synaptic GABA_A receptors in *mdx* mice is not associated with significant changes in the total amount of GABA_A-receptor protein, suggesting that dystrophin is dispensable for GABA_A-receptor anchoring but rather participates to the dynamic stabilization of large synaptic receptor clusters (15,64,68,69). The loss of dystrophin would thus result in a partial loss of synaptic clusters due to the lateral diffusion of unstable receptors to extrasynaptic sites, with putative changes in the combination of specific receptor subunits leading to complex alterations of GABA_A receptor pharmacology (18,70). This was further supported by an electrophysiological study showing that dystrophin-deficient cerebellar neurons of *mdx* mice display reduced synaptic inhibition but enhanced sensitivity to THIP, a selective pharmacological activator of extrasynaptic GABA_A receptors (20). THIP, or gaboxadol, is a systemically active partial agonist for GABA_A receptors with a higher selectivity for the δ subunit that is specifically contained in most extrasynaptic GABA_A receptors. This strongly supports the hypothesis that dystrophin loss increases the extrasynaptic expression of GABA_A receptors. High-affinity δ -containing extrasynaptic receptors mediate non-desensitizing tonic inhibition and are persistently activated by low ambient GABA, in contrast to phasic inhibition that is controlled by postsynaptic GABA_A receptors. They possess unique current-gating properties that play a role in controlling neuronal excitability, plasticity and neuronal sensitivity to neurosteroids (71,72). Interestingly, altered tonic inhibition and expression of δ GABA_A receptors have been linked to several pathological conditions relevant to the phenotypes of DMD patients, such as intellectual disability and epilepsy, and to the phenotypes of *mdx* mice, such as anxiety (72), stress adaptation (73–75) and fear conditioning (76).

Because of its higher selectivity for the δ subunit, THIP constitutes a unique tool to determine whether altered expression of extrasynaptic GABA_A receptors plays a role in DMD pathophysiology. One major finding in the present study is the demonstration that *mdx* mice are more sensitive to the behavioral effects of THIP, which strongly supports this hypothesis. As many other pharmacological modulators of GABAergic function, THIP may induce distinct functional alterations in a dose-dependent manner, including hypnotic, sleep-promoting, antinociceptive, anticonvulsant, sedative and anxiolytic effects (28–30). We therefore compared the effects of three doses of THIP (3, 10 and 30 mg/kg) known to have main effects on anxiety, sedation and hypnosis, respectively. While the lowest dose of THIP induced comparable effects in both genotypes, we found that *mdx* mice were more sensitive to higher doses of THIP that usually mediate sedative/ataxic and hypnotic effects in mice. The main effect of 10 mg/kg THIP in *mdx* mice was a drastic reduction of vertical activity, a parameter that is typically altered in stressed *mdx* mice, suggesting that altered tonic inhibition might participate to motor inhibition processes in this model. This suppression of vertical activity in *mdx* mice may reflect a change in arousal, motivational and/or emotional states, but putative alterations of central mechanisms controlling nociception, balance and/or motor/muscle functions cannot be ruled out (77). The hypnotic effect of a higher dose of THIP (30 mg/kg), characterized by shorter latency and longer duration of the loss of righting reflex (LORR), was drastically enhanced in *mdx* mice. Interestingly, this was comparable to the phenotype reported in

mice overexpressing $\alpha 6$ subunit-containing extrasynaptic receptors (30) but opposite to that of mice lacking the extrasynaptic δ subunit (78). As subsets of both synaptic and extrasynaptic receptors are affected in *mdx* mice, there is a need for future studies to specify the molecular and functional consequences of defective GABAergic inhibition in this model. It is likely that the molecular alterations in *mdx* mice are subject to local and temporal modifications due to the homeostatic competition between tonic and phasic inhibition to maintain total inhibition (79) and because receptor composition and diffusional trafficking between synaptic and extrasynaptic sites also varies during network activity and plasticity to finely tune inhibitory sensitivity (80–82). Our present results suggest that the altered tonic conductance mediated by δ GABA_A extrasynaptic receptors in *mdx* mice may regulate important behavioral and physiological functions. Therefore, this subtype of GABA_A receptors might be a relevant therapeutic target for DMD and animal models of this disease.

Conclusions

Although the increased prevalence of anxiety and mood disorders in DMD/BMD patients may partly result from their clinical condition and quality of life, mouse studies as well as recent neuropsychological studies have given greater consideration to the contribution of a central component in the genesis of emotional and neuropsychiatric disturbances in these syndromes (11,83–85). Our present data are in line with recent clinical studies suggesting that emotional disturbances are common in DMD patients with mutations that specifically impede expression of Dp427 dystrophin (11). Information on the emotional aspects of *mdx* mice is therefore important to further understand DMD neuropathology and may also provide valuable functional readouts in preclinical studies (12). However, the nature and severity of the cognitive impairments in DMD may vary depending on individual's mutation profile, as distal mutations may alter expression of shorter dystrophin-gene products having distinct functions in brain (11,51). Our present results suggest that loss of full-length dystrophin alters the functioning of the neuronal circuit of fear, which includes the amygdala and connected subcortical and cortical structures, leading to enhanced unconditioned fears, anxiety and deficits in fear conditioning and memories. Recognizing, avoiding and adapting to aversive situations are central aspects of mammalian cognition. Dysfunctions in these processes may result in severe changes in emotional reactivity, maladaptive social behaviors and decreased intellectual functioning (42,86,87). Moreover, we show that enhanced fearfulness in *mdx* mice induces long-lasting motor inhibition. This highlights that brain and behavioral dysfunctions may also significantly influence motor outcome measures in this model, which might lead to an overestimation of motor deficits and/or be confused with responses of lack of responses to treatments in preclinical studies. Our data also support the current hypothesis that altered spatial localization of GABA_A receptors and altered tonic GABAergic inhibition underlie part of the central disturbances due to Dp427 loss, suggesting that extrasynaptic GABA_A receptors should be further considered as candidate targets for future therapeutic developments.

Materials and Methods

Animals and experimental groups

Mice of the C57BL/10ScSn-Dmd^{mdx}/J (*mdx*) and C57BL/10ScSn strains were originally purchased from Charles River Laboratories

(France) and Harlan (UK), respectively, and then bred in our laboratory. Dystrophin-deficient *mdx* and wild-type littermate male mice (WT) were obtained by mating heterozygous *mdx* females with C57BL/10ScSn males. Siblings were kept in group (two to five per cage) under a 12-h light-dark cycle (light on: 7.00 a.m.) with food and water *ad libitum*. Only the cages containing mice of both genotypes were selected for experiments. Behavioral testing was performed blind to the genotype by a male experimenter. Mouse genotype was verified by PCR and confirmed by post-mortem histological analysis of quadriceps muscle (21). Animal care and experimental procedures complied with the European Communities Council Directive (CEE 86/609/EEC), EU Directive 2010/63/EU, French National Committee (87/848) and ethic committee (Paris Centre et Sud, N° 59).

Mice were changed to individual caging 1 week and given daily handling during at least 3 days before testing. A first group of mice aged 3 months ($n = 14$ per genotype) was submitted to a series of behavioral tests with intervals of 3–5 days between tests, in the following order: restraint-induced unconditioned fear, OF activity, forced swim test, tail-suspension test, single-trial contextual fear conditioning and inverted screen test. Independent groups of naïve mice aged 4–6 months were submitted to the other tests. One group of 9-month old mice was tested for restraint-induced stress to assess aging effects on this behavioral response. Pharmacological experiments (effects of THIP on behavior) were performed in 3-months old mice.

Behavioral tests

Restraint-induced unconditioned fear. The mouse was restrained by grasping the scruff and back skin between thumb and index fingers, while securing the tail between the third and little fingers and tilting the animal upside-down in order that the ventral part of its body faced the experimenter. After 15 s, the mouse was released to a novel cage (24×19 cm, with 12-cm high walls) containing clean sawdust and was then video-tracked for 5 min under dim illumination (80 lx) using the Any-maze software (Stoelting, USA). Unconditioned fear responses induced by this short acute stress were characterized by periods of tonic immobility (freezing) and quantified during a 5-min recording period. Complete immobilization of the mouse, except for respiration, was regarded as a freezing response (88). The percent time spent freezing was calculated for group comparisons. In separate groups of mice, fear responses were analyzed following restraint applied by grasping the scruff without tilting upside-down animal's body ("scruff—not tilted" condition), or by placing individual mice horizontally in a transparent polypropylene cylinder (3 cm diameter, 10 cm long) provided with ample air holes for ventilation (tube condition). Extinction of the freezing response was analyzed by repeating scruff restraint either once a day during 6 days (5-min recording each day) or during 18 trials distributed within the same day and grouped in three blocks of six trials (20 min intertrial interval (ITI); 90 min interval between blocks; 3 min recording per trial).

OF activity. The test box was a square OF ($50 \times 50 \times 50$ cm) with black walls and a floor covered with sawdust. Experiments were undertaken under constant room temperature (22–23 °C) and homogeneous dim illumination (50 lx). Each mouse was released near the wall and video-tracked for 30 min using the Any-maze software. Recorded xy positions were used to generate tracking plot of the exploration paths and to calculate the distance travelled, speed and time spent in distinct zones of the box, i.e. in the whole apparatus, in a virtual corridor (width: 10 cm)

along the walls and in the remaining central area, referred to as the center area. Latency of the first entry, number of entries, percent distance travelled in center area and circling sequences along walls were calculated as relative measures of anxiety.

Elevated plus-maze anxiety test. The maze had two facing arms enclosed with high walls ($20 \times 8 \times 25$ cm), two open arms (20×8 cm) and a central area (8×8 cm) forming a plus sign 65 cm above the floor. Illumination was 150 lx in open and 30 lx in enclosed arms. Mice were individually placed at the center of the maze with the head facing an open arm. The number of entries and time spent in open or enclosed arms were recorded for 5 min. Head-dipping over sides of open arms were counted and classified as protected head dips, when the rest of the mouse's body remained in a closed arm, and as unprotected head dips when the whole mouse's body was located in the open arm.

Light-dark choice. The apparatus had 20 cm-high Plexiglas walls and consisted of a brightly lit white compartment (40×15 cm; illumination: 600 lx) connected by a trap door (6×6 cm) to a dark compartment (15×15 cm; illumination < 10 lx). Each mouse was placed in the dark compartment for 10 s, the trap door was then opened and mice allowed to freely explore the whole apparatus for 5 min. Step through latency, number of entries and total time spent in the lit compartment were scored.

Forced swim test. Each mouse was lowered in an inescapable glass cylinder (Diameter: 11 cm; height: 23 cm) filled with 18 cm water at 25 °C (39). Room temperature was 25 °C. Behavior was recorded on video for 5 min each day in two sessions separated by a 24 h delay. Video were analyzed offline using event-recorder keys in Any-maze to quantify the latency and duration of three main parameters (25,26): climbing, staying afloat and immobility (freezing). Climbing was considered when mice had a vertical position of the spine with the forepaws striking the glass walls while hind paws showed repetitive movement in water. Staying afloat corresponded to movements simply performed to keep the head above water. Immobility was defined by a complete immobilization of the body for at least 1 s. The time not spent performing any one of these activities represented either unspecific uncoordinated movements or swimming activity involving horizontal spine position with legs treading water and producing a clear displacement of body.

TST. Each mouse was suspended by adhesive tape placed 2 cm from the tip of the tail, 35 cm above a bench top during a 6 min period (40,89). Behavior was recorded on video during two sessions separated by a 24 h delay. The latency to the first bout of immobility (freezing latency) and the duration of freezing were quantified offline using event-recorder keys in Any-maze. Complete immobility for > 2 s was regarded as freezing.

Inverted screen test. Mice were placed individually on a cage wire screen about 35 cm above a table. After slowly inverting the screen upside-down to 180° the ability to maintain a grip was monitored (grip latency) and a maximum score of 120 s given if the animal did not fall. Testing was repeated three times with 10-min ITIs.

Circadian modulation of locomotor activity. The apparatus was a computerized soundproof multi-box infrared-sensitive motion detection system (Imetronic, Pessac, France). It was composed of eight individual cages ($30 \times 15 \times 18$ cm, with sawdust on the floor), each containing a food dispenser and a water bottle and two parallel horizontal lines of infrared captors mounted along the longer side walls. Cages were illuminated 12 h per day starting from 7 a.m. Each mouse was introduced into an activity cage at 3.30 p.m. and left undisturbed for 24 h. Horizontal and vertical activities were measured by beam breaks in 1 h bins.

Conditioned taste aversion. Procedure was as previously described (90). Three days prior to testing, mice were placed on a water-restriction regime with access to water for 30 min/day, from two identical bottles placed in their home cages. Mice were handled and weighted each day to assess general effects of restriction regime. The bottles were weighed to evaluate fluid consumption. On the conditioning day, mice had free access to a 15%-sucrose solution for 30 min, in two identical bottles. One hour later, mice were injected (i.p.) with either 0.9% saline, or lithium chloride (LiCl: 0.3 M, 2% body weight). Twenty-four hours later, mice were given a two-bottle choice test between the water and sucrose for 30 min. The relative position of the two bottles was counterbalanced between mice. Conditioned taste aversion was expressed as the percent sucrose solution consumed over total fluid intake.

Contextual fear conditioning. Contextual fear was studied in a conditioning box consisting of a grid floor (30 × 30 cm) enabling delivery of electric footshocks as unconditioned stimuli (US), and clear Plexiglas walls (45 cm in height) with no ceiling in order to allow full observation and videotracking. Experiments were performed under moderate illumination (80 Lx) and the box was washed with absolute ethanol before each test. A 5-min habituation session was followed on the next day by a 5-min acquisition session during which a footshock (0.4 mA, 2s) was delivered at 2.5 min as the US. Retention of conditioned fear was measured 24 h later, by placing the mouse in the same context for 5 min. Freezing was analyzed from videotracking plots (Any-maze, Stoelting), whereas the number of leanings (standing upright on the hind legs with one or two forepaws against the wall) was recorded using event-recorder keys and referred to as vertical activity. To evaluate fear memory while taking into account basal activity during habituation, the freezing behavior during retention was also normalized to the duration of immobility during habituation (21).

Auditory-cued fear conditioning. The conditioning procedure was carried out using the StartFear system (Panlab S.L., Barcelona). The conditioning chamber (25 × 25 × 25 cm) had three black methacrylate walls, a transparent front door, a grid floor connected to a shock scrambler and a speaker mounted on the ceiling used to deliver audible tones as CS. The conditioning chamber rested on a high sensitivity weight transducer system to generate an analogical signal reflecting animal's movement. The chamber was confined in a ventilated soundproof enclosure (67 × 53 × 55 cm) on an anti-vibration table with a surrounding 60-dB white noise. Interchangeable floors and walls (i.e. plain floor and white walls) were used to analyze retention of cued fear in a novel context. On the first day (acquisition), a 2-min baseline period was recorded before delivery of five CS-US pairs (Tone: 80 dB, 10 kHz, 30 s; footshocks: each at 0.4 mA for 2 s) with variable and pseudo-randomly distributed intervals between pairs of stimuli (60, 120 and 180 s). On the next day (retention), the session started by placing the mouse in a different context for 2 min (baseline) before delivery of four CS (80 dB, 10 kHz, 30 s) separated by intervals of variable durations (60, 90 and 120 s). Animal's movements were sampled at 50 Hz for quantitative analysis (FREEZING software, Panlab S.L., Barcelona). Freezing was analyzed during delivery of the CS (periods of 30 s) to specifically reflect associative learning performance (36).

Determination of ACTH response

Mice were either taken from their home cage directly, for baseline measures, or 1 min after a 15s scruff restraint. Mice were then anesthetized with isoflurane (Forene, Abbott-France) and blood plasma samples collected rapidly (<1 min) by intracardiac

puncture. All samples were collected on the same day between 9 and 10.30 a.m. Blood taking from distinct genotypes and groups (basal, restraint) was counterbalanced. ACTH concentration was determined in duplicate from ethylenediaminetetraacetic acid plasma samples using an automated enzyme chemiluminescent immunoassay (Immulite 2000, IDEXX-Alfort laboratory, France).

Behavioral effects of the extrasynaptic GABA_A-receptor agonist, THIP

The behavioral effects THIP, also called Gaboxadol, were analyzed following i.p. injections with distinct doses (3, 10 and 30 mg/kg; Sigma-Aldrich, France) or with 0.9% NaCl (saline control groups). To reduce stress reactivity in this experiment, the i.p. injections were performed without scruff restraint, by lifting up the rear body while the mouse was holding a grid with its forepaws. Low and moderate doses of THIP (3 and 10 mg/kg) were used to evaluate effects on motor and emotional parameters, by testing mice 30 min postinjection in the OF for 10 min or in the light-dark choice for 5 min. All tests were performed between 9 and 12 a.m. A higher dose (30 mg/kg) was administered to a third group to evaluate THIP-induced hypnosis, expressed by the LORR latency and duration. The LORR was determined every 4 min by turning the mouse in a supine position in 3 consecutive trials (5 s duration each) on a V-shaped polycarbonate trough. LORR was quantified when the mouse could not right itself in any of the three consecutive trials, while righting reflex recovery was considered when shown in at least one of the three trials.

Statistical Analyses

Data are presented as means ± SEM. Behavioral parameters were analyzed with the Statview 5.0 software (SPSS, USA). One or two-way analysis of variance were used, with genotype as the between-group factor and temporal variables (time, trial, session) as the within-group factor for repeated-measure comparisons. Multivariate analysis of interrelated variables recorded in the behavioral test battery was undertaken as described (91) using a factor analysis based on the principal component method. Extraction performed in each genotype separately was followed by an orthogonal rotation (Varimax) and the weight of each variable (i.e. their correlation coefficient) on extracted factors was calculated.

Supplementary Material

Supplementary Material is available at HMG online.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Association Française contre les Myopathies (AFM, France; MED2 2008) and Agence Nationale de la Recherche (ANR, France; ANR-14-CE13-0037-01 DYSther) to C.V. and by a PhD fellowship from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France) to R.C. The authors wish to thank P. Leblanc-Veyrac for intracardiac punctures, S. Granon for providing access to actimeter to test circadian locomotor activity, and the zootechnic platform in Orsay for mouse breeding, care and genotyping.

Conflict of Interest statement. None declared.

References

1. Sekiguchi, M., Zushida, K., Yoshida, M., Maekawa, M., Kamichi, S., Yoshida, M., Sahara, Y., Yuasa, S., Takeda, S. and Wada, K. (2009) A deficit of brain dystrophin impairs specific amygdala GABAergic transmission and enhances defensive behaviour in mice. *Brain*, **132**, 124–135.
2. Frésard, L., Leroux, S., Dehais, P., Servin, B., Gilbert, H., Bouchez, O., Klopp, C., Cabau, C., Vignoles, F., Feve, K. et al. (2012) Fine mapping of complex traits in non-model species: using next generation sequencing and advanced intercross lines in Japanese quail. *BMC Genomics*, **13**, 551.
3. Mori, T., Yanagisawa, Y., Kitani, Y., Sugiyama, M., Kishida, O. and Nishimura, K. (2015) Gene expression profiles in *Rana pirica* tadpoles following exposure to a predation threat. *BMC Genomics*, **16**, 258.
4. Nonneman, D.J., Brown-Brandl, T., Jones, S.A., Wiedmann, R.T. and Rohrer, G.A. (2012) A defect in dystrophin causes a novel porcine stress syndrome. *BMC Genomics*, **13**, 233.
5. McGreevy, J.W., Hakim, C.H., McIntosh, M.A. and Duan, D. (2015) Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis. Model. Mech.*, **8**, 195–213.
6. Klymiuk, N., Blutke, A., Graf, A., Krause, S., Burkhardt, K., Wuensch, A., Krebs, S., Kessler, B., Zakhartchenko, V., Kurome, M. et al. (2013) Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. *Hum. Mol. Genet.*, **22**, 4368–4382.
7. Selsby, J.T., Ross, J.W., Nonneman, D. and Hollinger, K. (2015) Porcine models of muscular dystrophy. *ILAR J*, **56**, 116–126.
8. Poysky, J. (2006) Behavior in DMD Study Group. Behavior patterns in Duchenne muscular dystrophy: report on the Parent Project Muscular Dystrophy behavior workshop 8-9 of December 2006, Philadelphia, USA. *Neuromuscul. Disord.*, **17**, 986–994.
9. Young, H.K., Barton, B.A., Waisbren, S., Portales Dale, L., Ryan, M.M., Webster, R.I. and North, K.N. (2008) Cognitive and psychological profile of males with Becker muscular dystrophy. *J. Child Neurol.*, **23**, 155–162.
10. Snow, W.M., Anderson, J.E. and Jakobson, L.S. (2013) Neuropsychological and neurobehavioral functioning in Duchenne muscular dystrophy: a review. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **37**, 743–752.
11. Ricotti, V., Mandy, W.P., Scoto, M., Pane, M., Deconinck, N., Messina, S., Mercuri, E., Skuse, D.H. and Muntoni, F. (2016) Neurodevelopmental, emotional, and behavioural problems in Duchenne muscular dystrophy in relation to underlying dystrophin gene mutations. *Dev. Med. Child Neurol.*, **58**, 77–84.
12. Goyenvalle, A., Griffith, G., Babbs, A., El Andaloussi, S., Ezzat, K., Avril, A., Dugovic, B., Chaussonnet, 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.
13. Knuesel, I., Mastrocola, M., Zuellig, R.A., Bornhauser, B., Schaub, M.C. and Fritschy, J.M. (1999) Short communication: altered synaptic clustering of GABA receptors in mice lacking dystrophin (mdx mice). *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 4457–4462.
14. Miranda, R., Sébrié, C., Degrouard, J., Gillet, B., Jaillard, D., Laroche, S. and Vaillend, C. (2009) Reorganization of inhibitory synapses and increased PSD length of perforated excitatory synapses in hippocampal area CA1 of dystrophin-deficient mdx mice. *Cereb. Cortex*, **19**, 876–888.
15. Vaillend, C., Perronnet, C., Ros, C., Gruszczynski, C., Goyenvalle, A., Laroche, S., Danos, O., Garcia, L. and Peltekian, E. (2010) Rescue of a dystrophin-like protein by exon skipping in vivo restores GABAA-receptor clustering in the hippocampus of the mdx mouse. *Mol. Ther.*, **18**, 1683–1688.
16. Krasowska, E., Zablocki, K., Górecki, D.C. and Swinny, J.D. (2014) Aberrant location of inhibitory synaptic marker proteins in the hippocampus of dystrophin-deficient mice: implications for cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One*, **9**, e108364.
17. Fuenzalida, M., Espinoza, C., Pérez, M., Tapia-Rojas, C., Cuitino, L., Brandan, E. and Inestrosa, N.C. (2016) Wnt signaling pathway improves central inhibitory synaptic transmission in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Neurobiol. Dis.*, **86**, 109–120.
18. Fritschy, J.M., Panzanelli, P. and Tyagarajan, S.K. (2012) Molecular and functional heterogeneity of GABAergic synapses. *Cell Mol. Life Sci.*, **69**, 2485–2499.
19. Suzuki, Y., Higuchi, S., Aida, I., Nakajima, T. and Nakada, T. (2016) Abnormal distribution of GABA(A) receptors in brain of Duchenne muscular dystrophy patients. *Muscle Nerve*, in press.
20. Kueh, S.L., Dempster, J., Head, S.I. and Morley, J.W. (2011) Reduced postsynaptic GABAA receptor number and enhanced gaboxadol induced change in holding currents in Purkinje cells of the dystrophin-deficient mdx mouse. *Neurobiol. Dis.*, **43**, 558–564.
21. Perronnet, C., Chagneau, C., Le Blanc, P., Samson-Desvignes, N., Mornet, D., Laroche, S., De La Porte, S. and Vaillend, C. (2012) Upregulation of brain utrophin does not rescue behavioral alterations in dystrophin-deficient mice. *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 2263–2276.
22. Vaughan, G.M., Becker, R.A., Allen, J.P., Goodwin, C.W., Jr, Pruitt, B.A., Jr and Mason, A.D. Jr (1982) Cortisol and corticotrophin in burned patients. *J. Trauma*, **22**, 263–273.
23. Calandrea, L., Favreau-Peigné, A., Bertin, A., Constantin, P., Arnould, C., Laurence, A., Lumineau, S., Houdelier, C., Richard-Yris, M.A., Boissy, A. et al. (2011) Higher inherent fearfulness potentiates the effects of chronic stress in the Japanese quail. *Behav. Brain Res.*, **225**, 505–510.
24. Rafael, J.A., Nitta, Y., Peters, J. and Davies, K.E. (2000) Testing of SHIRPA, a mouse phenotypic assessment protocol, on *Dmd*(mdx) and *Dmd*(mdx3cv) dystrophin-deficient mice. *Mamm. Genome*, **11**, 725–728.
25. Detke, M.J., Rickels, M. and Lucki, I. (1995) Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl.)*, **121**, 66–72.
26. Llorens-Martin, M.V., Rueda, N., Martinez-Cue, C., Torres-Aleman, I., Florez, J. and Trejo, J.L. (2007) Both increases in immature dentate neuron number and decreases of immobility time in the forced swim test occurred in parallel after environmental enrichment of mice. *Neuroscience*, **147**, 631–638.
27. Spearman, C. (1904) General intelligence, objectively determined and measured. *Am. J. Psychol.*, **15**, 201–293.
28. Chandra, D., Jia, F., Liang, J., Peng, Z., Suryanarayanan, A., Werner, D.F., Spigelman, I., Houser, C.R., Olsen, R.W., Harrison, N.L. et al. (2006) GABAA receptor alpha 4 subunits mediate extrasynaptic inhibition in thalamus and dentate gyrus and the action of gaboxadol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15230–15235.
29. Tornberg, J., Segerstråle, M., Kuleskaya, N., Voikar, V., Taira, T. and Airaksinen, M.S. (2007) *KCC2*-deficient mice show reduced sensitivity to diazepam, but normal alcohol-induced motor impairment, gaboxadol-induced sedation, and neurosteroid-induced hypnosis. *Neuropsychopharmacology*, **32**, 911–918.

30. Saarelainen, K.S., Ranna, M., Rabe, H., Sinkkonen, S.T., Möykkynen, T., Uusi-Oukari, M., Linden, A.M., Lüddens, H. and Korpi, E.R. (2008) Enhanced behavioral sensitivity to the competitive GABA agonist, gaboxadol, in transgenic mice over-expressing hippocampal extrasynaptic alpha6beta GABA(A) receptors. *J. Neurochem.*, **105**, 338–350.
31. Saint-Dizier, H., Constantin, P., Davies, D.C., Leterrier, C., Lévy, F. and Richard, S. (2009) Subdivisions of the arcopallidum/posterior pallial amygdala complex are differentially involved in the control of fear behaviour in the Japanese quail. *Brain Res. Bull.*, **79**, 288–295.
32. Yamamoto, K., Yamada, D., Kabuta, T., Takahashi, A., Wada, K. and Sekiguchi, M. (2010) Reduction of abnormal behavioral response to brief restraint by information from other mice in dystrophin-deficient mdx mice. *Neuromuscul. Disord.*, **20**, 505–511.
33. Bostick, B., Shin, J.H., Yue, Y., Wasala, N.B., Lai, Y. and Duan, D. (2012) AAV micro-dystrophin gene therapy alleviates stress-induced cardiac death but not myocardial fibrosis in > 21-month mdx mice, an end-stage model of Duchenne muscular dystrophy cardiomyopathy. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **53**, 217–222.
34. Chaudhari, M.R., Fallavollita, J.A. and Farkas, G.A. (2016) The effects of experimental sleep apnea on cardiac and respiratory functions in 6 and 18 month old dystrophic (mdx) mice. *PLoS One*, **11**, e0147640.
35. Murphy, S., Dowling, P., Zweyer, M., Mundegar, R.R., Henry, M., Meleady, P., Swandulla, D. and Ohlendieck, K. (2016) Proteomic analysis of dystrophin deficiency and associated changes in the aged mdx-4cv heart model of dystrophinopathy-related cardiomyopathy. *J. Proteomics*, **145**, 24–36.
36. Chaussonot, R., Edeline, J.M., Le Bec, B., El Massioui, N., Laroche, S. and Vaillend, C. (2015) Cognitive dysfunction in the dystrophin-deficient mouse model of Duchenne muscular dystrophy: a reappraisal from sensory to executive processes. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **124**, 111–122.
37. Ornstein, K. and Amir, S. (1981) Pinch-induced catalepsy in mice. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **95**, 827–835.
38. Manning, J., Kulbida, R., Rai, P., Jensen, L., Bouma, J., Singh, S.P., O'Malley, D. and Yilmazer-Hanke, D. (2014) Amitriptyline is efficacious in ameliorating muscle inflammation and depressive symptoms in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Exp. Physiol.*, **99**, 1370–1386.
39. Porsolt, R.D., Le Pichon, M. and Jalfre, M. (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, **266**, 730–732.
40. Steru, L., Chermat, R., Thierry, B. and Simon, P. (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, **85**, 367–370.
41. Herman, J.P., McKlveen, J.M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., Scheimann, J. and Myers, B. (2016) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Compr. Physiol.*, **6**, 603–621.
42. Rosen, J.B. (2004) The neurobiology of conditioned and unconditioned fear: a neurobehavioral system analysis of the amygdala. *Behav. Cogn. Neurosci. Rev.*, **3**, 23–41.
43. Butler, T., Pan, H., Tuescher, O., Engelen, A., Goldstein, M., Epstein, J., Weisholtz, D., Root, J.C., Protopopescu, X., Cunningham-Bussel, A.C. et al. (2007) Human fear-related motor neurocircuitry. *Neuroscience*, **150**, 1–7.
44. Kong, E., Monje, F.J., Hirsch, J. and Pollak, D.D. (2014) Learning not to fear: neural correlates of learned safety. *Neuropsychopharmacology*, **39**, 515–527.
45. Spurney, C.F., Gordish-Dressman, H., Guerron, A.D., Sali, A., Pandey, G.S., Rawat, R., Van Der Meulen, J.H., Cha, H.J., Pistilli, E.E., Partridge, T.A. et al. (2009) Preclinical drug trials in the mdx mouse: assessment of reliable and sensitive outcome measures. *Muscle Nerve*, **39**, 591–602.
46. Crestani, F., Lorez, M., Baer, K., Essrich, C., Benke, D., Laurent, J.P., Belzung, C., Fritschy, J.M., Lüscher, B. and Mohler, H. (1999) Decreased GABAA-receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threat cues. *Nat. Neurosci.*, **2**, 833–839.
47. Phillips, R.G. and LeDoux, J.E. (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.*, **106**, 274–285.
48. Josselyn, S.A., Kida, S. and Silva, A.J. (2004) Inducible repression of CREB function disrupts amygdala-dependent memory. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **82**, 159–163.
49. Uematsu, A., Kitamura, A., Iwatsuki, K., Uneyama, H. and Tsurugizawa, T. (2015) Correlation between activation of the prelimbic cortex, Basolateral Amygdala, and Agranular Insular Cortex During Taste Memory Formation. *Cereb. Cortex*, **25**, 2719–2728.
50. Janak, P.H. and Tye, K.M. (2015) From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*, **517**, 284–292.
51. Perronnet, C. and Vaillend, C. (2010) Dystrophins, utrophins, and associated scaffolding complexes: role in mammalian brain and implications for therapeutic strategies. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2010**, 849426.
52. Dallérac, G., Perronnet, C., Chagneau, C., Leblanc-Veyrac, P., Samson-Desvignes, N., Peltekian, E., Danos, O., Garcia, L., Laroche, S., Billard, J.M. et al. (2011) Rescue of a dystrophin-like protein by exon skipping normalizes synaptic plasticity in the hippocampus of the mdx mouse. *Neurobiol. Dis.*, **43**, 635–641.
53. Hall, J., Thomas, K.L. and Everitt, B.J. (2001) Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *J. Neurosci.*, **21**, 2186–2193.
54. Sparta, D.R., Smithuis, J., Stamatakis, A.M., Jennings, J.H., Kantak, P.A., Ung, R.L. and Stuber, G.D. (2015) Inhibition of projections from the basolateral amygdala to the entorhinal cortex disrupts the acquisition of contextual fear. *Front. Behav. Neurosci.*, **8**, 129.
55. Engin, E., Smith, K.S., Gao, Y., Nagy, D., Foster, R.A., Tsvetkov, E., Keist, R., Crestani, F., Fritschy, J.M., Bolshakov, V.Y. et al. (2016) Modulation of anxiety and fear via distinct intrahippocampal circuits. *Elife*, **5**, e14120.
56. Surget, A. and Belzung, C. (2009) Unpredictable chronic mild stress in mice. In Kalueff, A.V. and LaPorte, J.L. (eds), *Experimental Animals Models in Neurobehavioral Research*. Nova Science Publishers Inc., Hauppauge, NY, pp. 79–112.
57. Jones, R.B., Mills, A.D. and Faure, J.M. (1991) Genetic and experiential manipulation of fear-related behavior in Japanese quail chicks (*Coturnix coturnix japonica*). *J. Comp. Psychol.*, **105**, 15–24.
58. Clément, Y., Le Guisquet, A.M., Venault, P., Chapouthier, G. and Belzung, C. (2009) Pharmacological alterations of anxious behaviour in mice depending on both strain and the behavioural situation. *PLoS One*, **4**, e7745.
59. Sogos, V., Reali, C., Fanni, V., Curto, M. and Gremo, F. (2003) Dystrophin antisense oligonucleotides decrease expression of nNOS in human neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **118**, 52–59.
60. Zhang, J., Huang, X.Y., Ye, M.L., Luo, C.X., Wu, H.Y., Hu, Y., Zhou, Q.G., Wu, D.L., Zhu, L.J. and Zhu, D.Y. (2010) Neuronal

- nitric oxide synthase alteration accounts for the role of 5-HT_{1A} receptor in modulating anxiety-related behaviors. *J. Neurosci.*, **30**, 2433–2441.
61. Cohen, E.J., Quarta, E., Fulgenzi, G. and Minciacchi, D. (2015) Acetylcholine, GABA and neuronal networks: a working hypothesis for compensations in the dystrophic brain. *Brain Res. Bull.*, **110**, 1–13.
 62. Griebel, G., Moreau, J.L., Jenck, F., Misslin, R. and Martin, J.R. (1994) Acute and chronic treatment with 5-HT reuptake inhibitors differentially modulate emotional responses in anxiety models in rodents. *Psychopharmacology (Berl.)*, **113**, 463–470.
 63. Kutlu, M.G. and Gould, T.J. (2015) Nicotine modulation of fear memories and anxiety: Implications for learning and anxiety disorders. *Biochem. Pharmacol.*, **97**, 498–511.
 64. Kueh, S.L., Head, S.I. and Morley, J.W. (2008) GABA(A) receptor expression and inhibitory post-synaptic currents in cerebellar Purkinje cells in dystrophin-deficient mdx mice. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **35**, 207–210.
 65. Vaillend, C., Billard, J.M. and Laroche, S. (2004) Impaired long-term spatial and recognition memory and enhanced CA1 hippocampal LTP in the dystrophin deficient Dmd(mdx) mouse. *Neurobiol. Dis.*, **17**, 10–20.
 66. Vaillend, C. and Billard, J.M. (2002) Facilitated CA1 hippocampal synaptic plasticity in dystrophin-deficient mice: role for GABA(A) receptors? *Hippocampus*, **12**, 713–717.
 67. Anderson, J.L., Morley, J.W. and Head, S.I. (2010) Enhanced homosynaptic LTD in cerebellar Purkinje cells of the dystrophic MDX mouse. *Muscle Nerve*, **41**, 329–334.
 68. Brünig, I., Suter, A., Knuesel, I., Lüscher, B. and Fritschy, J.M. (2002) GABAergic terminals are required for postsynaptic clustering of dystrophin but not of GABA(A) receptors and gephyrin. *J. Neurosci.*, **22**, 4805–4813.
 69. Lévi, S., Grady, R.M., Henry, M.D., Campbell, K.P., Sanes, J.R. and Craig, A.M. (2002) Dystroglycan is selectively associated with inhibitory GABAergic synapses but is dispensable for their differentiation. *J. Neurosci.*, **22**, 4274–4285.
 70. Korpi, E.R., Mihalek, R.M., Sinkkonen, S.T., Hauer, B., Hevers, W., Homanics, G.E., Sieghart, W. and Lüddens, H. (2002) Altered receptor subtypes in the forebrain of GABA(A) receptor delta subunit-deficient mice: recruitment of gamma 2 subunits. *Neuroscience*, **109**, 733–743.
 71. Carver, C.M. and Reddy, D.S. (2013) Neurosteroid interactions with synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors: regulation of subunit plasticity, phasic and tonic inhibition, and neuronal network excitability. *Psychopharmacology (Berl.)*, **230**, 151–188.
 72. Whissell, P.D., Lecker, I., Wang, D.S., Yu, J. and Orser, B.A. (2015) Altered expression of δ GABA(A) receptors in health and disease. *Neuropharmacology*, **88**, 24–35.
 73. Maguire, J. and Mody, I. (2007) Neurosteroid synthesis-mediated regulation of GABA(A) receptors: relevance to the ovarian cycle and stress. *J. Neurosci.*, **27**, 2155–2162.
 74. Serra, M., Mostallino, M.C., Talani, G., Pisu, M.G., Carta, M., Mura, M.L., Floris, I., Maciocco, E., Sanna, E. and Biggio, G. (2006) Social isolation-induced increase in alpha and delta subunit gene expression is associated with a greater efficacy of ethanol on steroidogenesis and GABA receptor function. *J. Neurochem.*, **98**, 122–133.
 75. Liu, Z.P., Song, C., Wang, M., He, Y., Xu, X.B., Pan, H.Q., Chen, W.B., Peng, W.J. and Pan, B.X. (2014) Chronic stress impairs GABAergic control of amygdala through suppressing the tonic GABA(A) receptor currents. *Mol. Brain*, **7**, 32.
 76. Jovasevic, V., Corcoran, K.A., Leaderbrand, K., Yamawaki, N., Guedea, A.L., Chen, H.J., Shepherd, G.M. and Radulovic, J. (2015) GABAergic mechanisms regulated by miR-33 encode state-dependent fear. *Nat. Neurosci.*, **18**, 1265–1271.
 77. Christensen, A.V., Svendsen, O. and Krosgaard-Larsen, P. (1982) Pharmacodynamic effects and possible therapeutic uses of THIP, a specific GABA-agonist. *Pharm. Weekbl. Sci.*, **4**, 145–153.
 78. Boehm, S.L., 2nd, Homanics, G.E., Blednov, Y.A. and Harris, R.A. (2006) Delta-Subunit containing GABA(A) receptor knockout mice are less sensitive to the actions of 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo [5,4-c]pyridin. *Ol. Eur. J. Pharmacol.*, **541**, 158–162.
 79. Wu, X., Huang, L., Wu, Z., Zhang, C., Jiang, D., Bai, Y., Wang, Y. and Chen, G. (2013) Homeostatic competition between phasic and tonic inhibition. *J. Biol. Chem.*, **288**, 25053–25065.
 80. Thomas, P., Mortensen, M., Hosie, A.M. and Smart, T.G. (2005) Dynamic mobility of functional GABA(A) receptors at inhibitory synapses. *Nat. Neurosci.*, **8**, 889–897.
 81. Bogdanov, Y., Michels, G., Armstrong-Gold, C., Haydon, P.G., Lindstrom, J., Pangalos, M. and Moss, S.J. (2006) Synaptic GABA(A) receptors are directly recruited from their extrasynaptic counterparts. *EMBO J.*, **25**, 4381–4389.
 82. Mele, M., Leal, G. and Duarte, C.B. (2016) Role of GABA(A) R trafficking in the plasticity of inhibitory synapses. *J. Neurochem.*, **139**, 997–1018.
 83. Filippo, T.D., Parisi, L. and Roccella, M. (2014) Psychological aspects in children affected by duchenne de boulogne muscular dystrophy. *Ment. Illn.*, **4**, e5.
 84. Banihani, R., Smile, S., Yoon, G., Dupuis, A., Mosleh, M., Snider, A. and McAdam, L. (2015) Cognitive and neurobehavioral profile in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J. Child Neurol.*, **30**, 1472–1482.
 85. Pangalila, R.F., van den Bos, G.A., Bartels, B., Bergen, M., Stam, H.J. and Roebroek, M.E. (2015) Prevalence of fatigue, pain, and affective disorders in adults with Duchenne muscular dystrophy and their associations with quality of life. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, **96**, 1242–1247.
 86. Rauch, S.L., Shin, L.M. and Wright, C.I. (2003) Neuroimaging studies of amygdala function in anxiety disorders. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **985**, 389–410.
 87. Miranda, R., Nagapin, F., Bozon, B., Laroche, S., Aubin, T. and Vaillend, C. (2015) Altered social behavior and ultrasonic communication in the dystrophin-deficient mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Mol. Autism*, **6**, 60.
 88. Paylor, R., Zhao, Y., Libbey, M., Westphal, H. and Crawley, J.N. (2001) Learning impairments and motor dysfunctions in adult Lhx5-deficient mice displaying hippocampal disorganization. *Physiol. Behav.*, **73**, 781–792.
 89. Aso, E., Ozaita, A., Valdizan, E.M., Ledent, C., Pazos, A., Maldonado, R. and Valverde, O. (2008) BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB1 knockout mice. *J. Neurochem.*, **105**, 565–572.
 90. Poirier, R., Jacquot, S., Vaillend, C., Southiphong, A.A., Libbey, M., Davis, S., Laroche, S., Hanauer, A., Welzl, H., Lipp, H.P. et al. (2007) Deletion of the Coffin-Lowry syndrome gene Rsk2 in mice is associated with impaired spatial learning and reduced control of exploratory behavior. *Behav. Genet.*, **37**, 31–50.
 91. Viollet, C., Vaillend, C., Videau, C., Bluet-Pajot, M.T., Ungerer, A., L'Héritier, A., Kopp, C., Potier, B., Billard, J., Schaeffer, J. et al. (2000) Involvement of sst2 somatostatin receptor in locomotor, exploratory activity and emotional reactivity in mice. *Eur. J. Neurosci.*, **12**, 3761–3770.

Chapitre II

Rôle de la dystrophine courte (Dp71)

I. Filtrage sensoriel et fonctions exécutives

1. Contexte de l'étude

Si l'absence de la dystrophine complète (Dp427) conduit à une altération musculaire évolutive et à des troubles cognitifs légers, la perte de la forme la plus courte de dystrophine, la Dp71, n'affecte pas le muscle mais entraîne une déficience intellectuelle sévère, une augmentation de la prévalence des déficits de mémoire de travail et des troubles neurodéveloppementaux encore mal caractérisés.

La Dp71 est la plus abondante des dystrophines dans le cerveau. Comme les autres dystrophines, sa partie C-terminale interagit avec les dystroglycanes transmembranaires, les protéines adaptatrices syntrophines et ceci joue un rôle dans l'ancrage et/ou l'agrégation (clustering) de certains récepteurs et canaux ioniques membranaires. La Dp71 est particulièrement exprimée dans les pieds des astrocytes périvasculaires où elle est requise pour le clustering des canaux aqueux (AQP4) et potassiques (Kir4.1), mais elle est aussi détectée au niveau des densités postsynaptiques où elle semble participer au clustering des récepteurs glutamatergiques, notamment dans l'hippocampe (Daoud *et al.*, 2009). Dans tous les cas, on suppose que la perte de Dp71 conduit à une augmentation de l'excitabilité des réseaux neuronaux, soit du fait d'une désorganisation moléculaire des synapses excitatrices glutamatergiques, soit du fait d'une augmentation des concentrations extracellulaires en potassium.

La déficience intellectuelle ne se limite pas à des déficits de mémoire à long terme et d'apprentissage, mais peut aussi impliquer des dysfonctions exécutives, comme des déficits de mémoire de travail, qui ont justement été identifiés chez des patients porteurs de mutations affectant l'expression de la Dp71 (Rocotti *et al.*, 2016). Ici, nous avons utilisé la souris Dp71-null, dont l'insertion du gène de la β -Galactosidase dans le premier exon de la Dp71 abolit son expression, afin d'élucider les mécanismes neurophysiologiques altérés dans le cortex préfrontal qui joue un rôle important dans les fonctions exécutives, particulièrement la balance excitation/inhibition et la plasticité synaptique. Ces analyses ont été complétées par de l'imagerie confocale du dystroglycane et de la PSD95, un marqueur des synapses glutamatergiques, et par une étude comportementale ciblant spécifiquement des tâches impliquant les fonctions exécutives qui dépendent du cortex préfrontal.

2. Méthodologie

Les souris Dp71-null utilisées pour les expérimentations ont été croisées sur plus de 10 générations avec des souris de lignée C57BL/6Rj afin que la modification génétique portée par ces souris s'exprime sur un fond génétique C57BL/6 pur, ce qui n'était pas le cas lors de la première étude de ce modèle par Daoud *et al.* (2009). Les expérimentations en immunohistochimie, microscopie confocale et comportement suivent les mêmes procédures que celles des deux articles sur la souris *mdx*. Ce sont donc des tests maîtrisés, validés et bien connus au sein de notre équipe. L'étude d'électrophysiologie a été réalisée par M. Amar, anciennement dans l'équipe de P. Fossier, spécialiste de l'étude

de la balance excitation/inhibition corticale et de l'extraction mathématique des différents courants excitateurs et inhibiteurs dans les réseaux corticaux. Toutes les statistiques et figures ont été réalisées à l'aide de MATLAB, en utilisant un code développé par R. Chaussonot, pour les besoins spécifiques à nos expérimentations. La validation des tests statistiques étant réalisée par la communauté MATLAB et la validation des résultats a été faite en comparant les résultats précédemment obtenus par Statview sur les souris *mdx* par rapport à ceux obtenus avec notre code (qui sont identiques).

3. Résultats

Nous avons commencé par confirmer l'intégrité des propriétés intrinsèques des neurones pyramidaux de la couche 5 du cortex préfrontal médian. Nous mettons en évidence une altération du clustering de deux protéines postsynaptiques normalement associées à la Dp71 dans la synapse glutamatergique (β -dystroglycane et PSD95), en accord avec les résultats *in vitro* de Daoud *et al.* (2009). La transmission glutamatergique basale est fortement augmentée chez les souris Dp71-null, suggérant une altération des récepteurs AMPA. Cette hypothèse a été testée en patch clamp, en présence de picrotoxine (antagoniste des récepteurs du GABA) et en imposant un potentiel spécifique à la cellule, pour isoler la composante excitatrice de la neurotransmission, et après addition de NBQX (antagoniste des récepteurs AMPA) ou d'APV (antagoniste des récepteurs NMDA) pour isoler la neurotransmission dépendant des récepteurs NMDA ou AMPA, respectivement. La composante inhibitrice a également pu être isolée en présence des deux antagonistes de la transmission glutamatergique. Un résultat majeur de l'étude est la mise en évidence d'une altération de la balance excitation/inhibition chez les souris Dp71-null. Chez les souris contrôles, on observe 18% d'excitation pour 82% d'inhibition, en revanche, la souris Dp71-null montre clairement un déséquilibre avec une balance de 26% d'excitation et 74% d'inhibition. Nous montrons que l'inhibition médiée par les récepteurs du GABA n'est pas affectée dans ce modèle et que les altérations touchent majoritairement les mécanismes postsynaptiques dans la synapse glutamatergique, avec pour conséquence une réduction importante de la plasticité synaptique (LTP) dans les réseaux du cortex préfrontal.

Au niveau comportemental, la souris Dp71-null ne présente pas de déficit du réflexe de sursaut induit par un stimulus auditif, ni de la capacité à l'inhiber en présence d'un stimulus prédictif de plus faible intensité. Elle est donc capable d'intégrer et filtrer correctement les stimuli sensoriels auditifs. En revanche, nous mettons en évidence une altération de sa flexibilité comportementale dans deux apprentissages impliquant la mémoire de référence spatiale (piscine de Morris et labyrinthe radial). La souris Dp71-null montre également un retard d'apprentissage dans le test de la piscine de Morris, suggérant une utilisation inadéquate des indices spatiaux, ou une stratégie égocentrée inadaptée à cette tâche. Nous montrons aussi une altération claire et robuste de la mémoire de travail chez la souris Dp71-null dans un test de non-appariement retardé de position (DNMTP, ou *delayed non-matching to place*) dans lequel la performance dépend de la sensibilité aux interférences induites par des choix successifs.

4. Conclusion

La souris Dp71-null reste un modèle relativement peu étudié dont on ignore encore beaucoup de propriétés. Chez l'Humain, la perte de Dp71 induit notamment une déficience intellectuelle sévère, une augmentation de la prévalence des déficits de mémoire de travail, de l'attention ou encore une tendance accrue aux troubles du spectre autistique. Chez la souris, nous mettons en évidence une absence d'altération des processus d'intégration et de filtrage sensoriel, mais en revanche, la souris Dp71-null présente des déficits d'apprentissage spatial et de flexibilité comportementale associés à une altération forte des processus de mémoire de travail. Ces phénotypes reposent habituellement sur un circuit incluant principalement l'hippocampe et le cortex préfrontal. Dans notre modèle, ces déficits sont associés à une altération de la fonction synaptique corticale, caractérisée par la désorganisation des protéines synaptiques β -dystroglycane et PSD95, une augmentation de la transmission dépendante des récepteurs AMPA, une augmentation de la part excitatrice de la balance excitation/inhibition, et une réduction de la plasticité synaptique. Une hyperexcitabilité des réseaux hippocampiques ayant été également décrite, nos résultats suggèrent que la perte de Dp71 altère considérablement les fonctions exécutives et cognitives qui mettent en jeu la boucle hippocampo-corticale. La balance excitation/inhibition corticale a fait l'objet de nombreuses études depuis la découverte de son implication dans les processus de mémoire de travail, l'autisme et la schizophrénie. Cet ensemble d'altérations pourraient constituer un endophénotype à la base de la déficience intellectuelle induite par la perte de Dp71 dans une sous-population de patients DMD.

Tous ces éléments suggèrent que la Dp71 pourrait effectivement posséder un rôle crucial dans la genèse des déficits cognitifs et neuropsychiatriques observés dans la myopathie de Duchenne et que les bases neurophysiologiques de ces déficits reposent sur une hyperexcitabilité des réseaux neuronaux. Reste à déterminer les mécanismes moléculaires, neuronaux ou gliaux, qui conduisent à cette perturbation, puisque la Dp71 semble s'exprimer et jouer un rôle à la fois dans les neurones et les cellules gliales. Ceci fait l'objet des projets en cours et futurs de l'équipe.

Article n°3

**A selective inactivation of
Dp71-dystrophin promoter
impairs executive
functions and prefrontal
cortex excitation-
inhibition balance**

(non publié)

A selective inactivation of Dp71-dystrophin promoter impairs executive functions and prefrontal cortex excitation-inhibition balance

Rémi Chaussonot¹, Muriel Amar^{1#}, and Cyrille Vaillend^{1*}

¹Neuroscience Paris-Saclay Institute (Neuro-PSI), UMR 9197, Université Paris Sud, CNRS, Université Paris Saclay, Orsay, France.

[#]Current address: Laboratoire de Toxinologie moléculaire et Biotechnologies, Institut des Sciences du Vivant Frédéric Joliot, CEA de Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France

^{*}Correspondence: Cyrille Vaillend (cyrille.vaillend@u-psud.fr)

Abstract

Genetic loss of Dp71 dystrophin protein in Duchenne muscular dystrophy (DMD) patients is associated with severe intellectual disability and higher incidence of working memory deficits and neuropsychiatric disorders. This major brain product of the *dmd* gene is normally expressed in both glial and neuronal cells. It is believed that Dp71 is a key player in the regulation of brain ion homeostasis and glutamatergic neurotransmission and Dp71 deficiency is therefore expected to increase excitability of neuronal networks. However, the exact neural mechanisms and cognitive processes affected by Dp71 loss are still unclear. In the present study, we found that the excitation/inhibition balance in prefrontal cortex of Dp71-null mice is shifted toward enhanced excitation, which was associated with specific alterations of AMPA receptor-mediated glutamatergic transmission and reduced synaptic plasticity. We further show that Dp71-null mice display deficits in cognitive processes that depend on prefrontal cortex integrity, such as cognitive flexibility and the sensitivity of working memory to proactive interference in spatial learning tasks. Our results therefore support the hypothesis that enhanced excitability of cortical neuronal network and related executive dysfunctions contribute to intellectual disability in DMD patients holding mutations that impede expression of brain Dp71.

Introduction

Cognitive deficits and comorbid diagnosis of neuropsychiatric disorders are well recognized features of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) syndrome, a common X-linked neuromuscular disorder caused by mutations in the dystrophin gene. The severity of central dysfunctions increases with mutations at the 3' end of the gene, which lead to cumulative loss of several dystrophin-gene products (Dp260, Dp140, Dp116 and Dp71) encoded by distinct internal promoters and normally expressed in the nervous system in a cell-specific manner (Lenk et al., 1993; Desguerre et al., 2009; Taylor et al., 2010; Milic Rasic et al., 2014). Although the molecular basis of the cognitive impairment is still poorly understood, reliable phenotype-genotype relationships indicate that genetic loss of all dystrophin products is associated with severe

intellectual disability (ID) and that Dp71 loss is a pivotal aggravating factor for cognitive status (Moizard et al., 2000; Daoud et al., 2009a). This has been further supported by identification of the first mutation that selectively alters Dp71 function and results in ID without muscular dystrophy (De Brouwer et al., 2014). However, the respective roles of brain dystrophins in selected cognitive functions and the core endophenotypes and neural mechanisms that lead to ID in a subset of DMD patients are still unclear. Whilst a range of cognitive and behavioral disturbances have been reported in heterogeneous cohorts of patients (Snow et al., 2013, for a review), a recent comprehensive study shows that mutations affecting Dp71 are associated with increased presence of working memory deficits and neuropsychiatric disorders as compared to more proximal mutations in the *dmd* gene (Ricotti et al., 2016), suggesting that impaired high-order cognitive and executive functioning bring about ID in patients lacking Dp71.

Dp71 is the shortest but most abundantly expressed dystrophin-gene product in the brain (Lederfein et al., 1992). In common with the other non-muscle dystrophins, Dp71 contains the cysteine rich and carboxy-terminus domains of dystrophin, which are required for binding to transmembrane dystroglycan and adapter-protein syntrophin involved in the membrane clustering of various ion channels and receptors (Waite et al., 2012). Dp71 is enriched in perivascular-astrocyte endfeet throughout the brain, where it is required for proper localization of AQP4 and Kir4.1 channels (Tadayoni et al., 2012), suggesting that its loss may alter both water and potassium homeostasis and thereby enhance neuronal excitability (Hendriksen et al., 2015). A pool of Dp71 is also expressed in postsynaptic densities and we previously showed that Dp71 loss induces learning deficits associated with alterations in the postsynaptic organization, ultrastructure and function of hippocampal glutamatergic synapses in mice (Daoud et al., 2009b; Miranda et al., 2011). Dp71-null mice were displaying a marked enhancement of basal glutamatergic transmission, suggesting that a central excitation/inhibition (E/I) imbalance might underlie brain dysfunctions in this model.

In the present study, we investigated neurophysiological mechanisms and behavioral processes associated with executive functioning in Dp71-null mice, which have a selective inactivation of the Dp71 promoter and do not display muscular dystrophy. We used patch-clamp techniques to determine the basal set-point value of E/I balance and its controlled maintenance following induction of synaptic plasticity in the prefrontal cortex, which plays a critical role in undertaking executive functions in mammals (Jones, 2002; Matzel et al., 2010). Confocal image analyses were performed to characterize synaptic expression of dystroglycan and glutamatergic-synapse marker PSD-95. Executive functions were assessed by means of behavioral tests evaluating mice capacity to timely process and gate sensory stimuli, spatial working memory performance, cognitive flexibility and social behavior, which all involve integrity of high-order neuronal networks including prefrontal cortex.

Materials and methods

Animals

Dp71-null mice were originally generated by homologous recombination by replacing most of the first and unique exon and a small part of the first intron of Dp71 by the promoter-less gene encoding a β -gal-neomycin resistance chimeric protein, which specifically abolishes the transcription of Dp71 mRNA without interfering with the expression of other dmd-gene products (Sarig et al., 1999). Transgenic mice were backcrossed for >10 generations to C57BL/6JRj mice (Janvier Labs, France) in CDTA (Orléans, France) and breeders were kindly provided by Dr. Alvaro Rendon (Institut de la Vision, Paris, France). Production and maintenance of the transgenic line was undertaken in our animal facility by crossing heterozygous females with C57BL/6JRj males to generate Dp71-null and littermate control (WT) male mice. Genotype was determined by detecting presence of the gene encoding β -gal in PCR analyses of tail DNA. Animals were kept under a 12-h light-dark cycle (light on: 7.00 a.m.) with food and water ad libitum. Independent groups of 10–16 weeks male siblings were used for behavioral testing; test mice were placed in individual caging at least 8 days before testing and most protocols were conducted as previously described (Chausseot et al., 2015; Miranda et al., 2015). Studies were conducted blind to the genotype, following guidelines of European Directive 2010/63/EU, French National Committee (87/848), mouse facility (agreement #D91-471-104) and ethical committee #59.

Semi-quantitative immunofluorescence and confocal image analyses

Brains dissected out following cervical dislocation were fresh-frozen in powdered dry ice and stored at -80°C . Coronal brains sections (30 μm thick) including the medial prefrontal cortex (mPFC) were cut at -12°C in a cryostat and collected on Superfrost⁺ glass slides (Roth, France). For immunocytochemistry, slides were thawed for 1 min at RT, immersed in acetone/methanol (1:1) for 5 min at -20°C , washed 3 times in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), incubated in a blocking solution for 45 min (10% normal goat serum, 0.3% Triton X-100, 1% bovine serum albumin) and then overnight at 4°C with primary polyclonal antibodies directed against the postsynaptic density protein PSD-95 (1:500, Invitrogen). Sections were then washed and incubated with a goat anti-rabbit secondary antibody conjugated to Cy3 (Jackson ImmunoResearch, USA) diluted 1:500 in PBS 0.1 M with 5% NGS and 1% BSA for 1h at RT. Slides were then washed and coverslipped using a mounting medium containing an instant-blue nuclear probe fluorescing (455 nm) compound (DAPI Fluoromount-G, Clinisciences, France). No staining was observed in sections processed from control sections from both genotypes when primary antibody was omitted.

A laser scanning confocal microscope LSM 700 (Zeiss) was used to sequentially collect Cy3 immunoreactivity at 555 nm and DAPI staining at 405 nm. Confocal images of mPFC were imported using an EC Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil M27 at a resolution of 156 nm/pixel. All images were randomly taken in layers 2/3 at same exposure times and equivalent stereotaxic coordinates (bregma: 2.8 mm to 2.46 mm; mouse brain Atlas; Paxinos & Franklin, 2001). Images were

processed for quantification using the WCIF ImageJ imaging system as follows: the punctate IR representing presumptive protein clusters, with a minimal size of clusters arbitrarily set to 3 adjacent pixels ($0,05 \mu\text{m}^2$) and a maximal size of $1 \mu\text{m}^2$, corresponding to more than 99% of the counted clusters. A threshold segmentation algorithm was used for automatic detection of clusters (Vaillend et al., 2010). The number and size of the clusters were analyzed within a total tissue surface of $43\,200 \mu\text{m}^2$ per genotype derived from 4 brain sections per animal. The Kolmogorov-Smirnov test (KS-Test) was used to compare the distribution of protein cluster sizes.

Electrophysiology

Whole-cell patch clamp recordings

Coronal brain slices ($250\mu\text{m}$ thick) including the medial prefrontal cortex (mPFC) were obtained at postnatal days 21-28 (P21- P28) and maintained at 33°C in an oxygenated (95% O_2 -5% CO_2) ice-cold artificial cerebrospinal extracellular solution (ACSF) containing (in mM) : 126 NaCl, 26 NaHCO_3 , 10 Glucose, 2 CaCl_2 , 1.5 KCl, 1.5 MgSO_4 and 1.25 KH_2PO_4 (pH 7.5, 310-330 mOsm). Somatic whole-cell voltage-clamp and current-clamp recordings were obtained with a Multiclamp 700B amplifier (Axon Instruments, USA) from layer 5 pyramidal neurons identified from the shape of their soma and primary dendrites using video-enhanced DIC (Hamamatsu Photonics, Japan) and from their current-induced firing profile. The borosilicate glass pipettes (3-5 $\text{M}\Omega$) were filled with (in mM) 140 K-gluconate, 10 HEPES, 4 ATP, 2 MgCl_2 , 0.4 GTP and 0.5 EGTA (pH 7.3 adjusted with KOH, 270-290 mOsm). Signals were filtered at 2 KHz by a low-pass Bessel filter and sampled at 4 KHz using a National Instruments BNC-2090A acquisition board. Voltage data were corrected off-line for a measured liquid junction potential of -10 mV. The membrane time constant (τ) of each cell was a voltage response induced by 50 pA hyperpolarizing steps (200 ms; repeated 12 times). Only cells with a resting potential ≤ -60 mV and an access resistance $< 25 \text{M}\Omega$ were kept for analysis. The access resistance was compensated off-line in voltage clamp mode and neurons exhibiting more than 10% of the access resistance during the experiment were rejected. Electrical stimulations (1-10 μA , 0.2 ms) were delivered within layers 2/3 of mPFC using a 1 $\text{M}\Omega$ impedance bipolar tungsten stimulating electrode (TST33A10KT, WPI, Hertfordshire, England). The stimulation intensity was adjusted in current-clamp conditions to induce a subthreshold postsynaptic response reflecting coactivation of excitatory and inhibitory circuits without recruiting dominant non-linear processes such as those induced by NMDA receptor (NMDAR) activation. Control experiments with the NMDAR blocker D-AP5 did not reveal any variation of the recorded responses. Responses with antidromic spikes were discarded. In voltage-clamp conditions, the frequency of stimulation was 0.05 Hz and five to eight responses were averaged for each holding potential. Control recordings were made after 15 min of patch-clamp equilibration at 0.05 Hz at 5-7 holding potentials around neuron resting potential and after 20 min of continuous drug perfusion. NBQX and D-AP5 were obtained from Ascent Scientific (Bristol, UK), spermine tetrahydrochloride, QX314, picrotoxin and TTX from Tocris (R&D Systems, France). All other drugs and chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Lyon, France).

Data were analyzed off-line with a specialized software known as Elphy™ at Biologic UNIC–CNRS by Sadoc G. (Gif-sur-Yvette, France). The method is based on the continuous measurement of conductance dynamics during stimulus-evoked synaptic response, as primary described *in vivo* in the cat cortex (Borg-Graham *et al.*, 1998; Monier *et al.*, 2003) and further validated in the rat visual cortex (Le Roux *et al.*, 2006; Moreau *et al.*, 2010) and mouse mPFC (Meunier *et al.*, 2013; 2015). Evoked synaptic currents measured and averaged at a given holding potential were used to construct I-V curves. The holding potential value (V_h) was corrected (V_{hc}) to account for the resistance drop due to current leakage through R_s (Resistance series) by the equation: $V_{hc}(t) = V_h(t) - I(t) \times R_s$. An average estimate of the cell input conductance waveform was calculated from the best linear fit (mean least square criterion) of the I-V curve for each delay (t) following stimulation onset. Cells showing a Pearson correlation > 0.95 with the I-V linear regression slope between -90 and -40 mV were used to calculate the conductance change in the recorded pyramidal neuron from the slope of the linear regression.

Excitatory/inhibitory (E/I) balance

Somatic recordings do not provide rigorous estimates of the synaptic events in distal dendrites and the conductance estimates are ratios of the overall excitatory and inhibitory drive contained in the stimulated local network (Haider *et al.*, 2006). However, relative changes in conductance magnitude reflect the cumulative contributions of excitation and inhibition that converge at proximal portions of the neuron and define a narrow window over which input integration and spike output can occur (Higley and Contreras, 2006). Therefore, we estimated the E/I balance through the decomposition of synaptic conductance changes as previously described (Le Roux *et al.*, 2006): The evoked synaptic global conductance term $g_T(t)$ was first calculated by subtracting the resting conductance (g_{rest}) from input conductance. The apparent reversal potential of the synaptic conductance at the soma ($E_{syn}(t)$) was taken as the voltage abscissa of the intersection point between the I-V curve obtained at a given time (t) and that determined at rest. Assuming that the evoked somatic conductance change reflects the composite synaptic input reaching the soma, $E_{syn}(t)$ characterizes the stimulation-locked dynamics of the excitation/inhibition balance.

To decompose the global evoked synaptic conductance ($g_T(t)$) into excitatory and inhibitory components ($g_E(t)$ and $g_I(t)$), each associated with known and fixed reversal potentials. The following simplification was used: $I_{syn}(t) = g_E(t) (E_{syn}(t) - E_{exc}) + g_I(t) (E_{syn}(t) - E_{inh})$ and $g_T(t) = g_E(t) + g_I(t)$ where $I_{syn}(t)$ is the total synaptic current, $E_{syn}(t)$ is the apparent reversal potential at the soma, $g_E(t)$ and $g_I(t)$ are excitatory and inhibitory conductances respectively and E_{exc} and E_{inh} are the reversal potentials for excitation and inhibition currents (Program written by C. Monier, CNRS UNIC, France). The I-V curve in layer 5 of the mPFC was linear between -80 to $+10$ mV with a reversal potential equal to -80 mV in the presence of excitatory transmission blockers (CNQX, D-AP5) and to 0 mV in the presence of the bicuculline blocker of inhibitory inputs (Le Roux *et al.*, 2006). $E_{syn}(t)$ was extrapolated from I-V curves in which it took any intermediate values between -80 mV and -40 mV (Le Roux *et al.*, 2006 supplementary data), *i.e.* within the limits of the voltage range (-90 to -40 mV) corresponding to the linear part of I-V curves.

Esyn(t) was also within the limits of Einh and Eexc values, in order to fulfill the mathematical conditions for simplification of the gl(t) and gE(t) calculation. Synaptic conductance changes were quantified as integrals (int) within a 200 ms time window in order to reach a better reproducibility than with direct measurement of peak conductance. The contribution of each component of the E/I balance was expressed by the ratio of its integral values (intgE or intgI) and the global conductance change (intgT).

Synaptic transmission

Synaptic efficacy was first evaluated by means of input/output (I/O) curves generated using a range of stimulus intensities from 0 to 40 V. Four responses were averaged at each intensity. NMDAr-mediated synaptic responses were isolated in the presence of a GABA_A receptor antagonist (picrotoxin, 50 μ M) and an AMPA receptor antagonist NBQX, 10 μ M) at a holding potential of -40mV. Dependence on NMDAr activation was confirmed by applying an NMDAr antagonist (D-AP5, 50 μ M). To estimate the NMDA/AMPA ratio, the recording pipettes were filled with (in mM) 115 CH₃CsSO₃, 20 CsCl, 10 Hepes, 2.5 MgCl₂, 4 Na₂ATP, 0.4 NaGTP, 10 Na-p-creatinine, 0.6 EGTA, 0.1 spermine tetrahydrochloride, 5 QX314 (280-300 mOsm, pH 7.3 adjusted with CsCL OH). Pyramidal neurons in layer 5 were clamped at -75 mV and AMPAR-mediated EPSCs were recorded in response to single pulses delivered at 0.05Hz in layer 2/3. NBQX (10 μ M) was then applied to ACSF and the holding potential changed to +40 mV to isolate NMDAr-mediated EPSCs. Picrotoxin (50 μ M) was present to block GABA_A receptor-mediated currents.

Spontaneous miniature excitatory post synaptic currents (mEPSC) were recorded at -75 mV in whole cell configuration using a pipette filled with the K⁺- gluconate and in the presence of bath-applied sodium channel blocker tetrodotoxin (TTX, 1 μ M) , D-AP5 (50 μ M) and picrotoxin (50 μ M) . NBQX (10 μ M) suppressed mEPSCs thus confirming their dependence on AMPAR activation. Spontaneous miniature inhibitory post synaptic currents (mIPSC) were recorded at a holding potential of -75 mV using a pipette internal solution that stabilizes the Cl⁻ reversal potential around -35 mV, in the presence of bath-applied TTX (1 μ M), NBQX (10 μ M) and D-AP5 (50 μ M). Picrotoxin (50 μ M) suppressed mIPSCs thus confirming their dependance on GABA_AR activation. The amplitude and frequency of at least 300 mEPSCs and 300 mIPSCs were analysed with the ELPHY software (ElphyTM, Gerard Sadoc, Biologic UNIC–CNRS, Gif-sur-Yvette, France).

Synaptic plasticity

Paired pulse facilitation (PPF) of evoked EPSCs was examined at varying inter-stimulus intervals (ISI from 50 to 700 ms), using a stimulation intensity corresponding to one third of the intensity necessary to elicit an action potential. Four responses were averaged for each ISI. Long-term synaptic plasticity was induced in prefrontal cortical layer 2/3 by high frequency stimulation (HFS) using a theta burst protocol (3 trains of 13 bursts at 5Hz, each burst comprising 4 pulses at 100Hz; 2 min total duration), while layer 5 neurons being under current clamp (I=0) ([Abraham and Huggett 1997](#)). Data were recorded 15, 30, 45, and 60 min after HFS and compared to baseline

recordings. Synaptic plasticity was considered when the induced changes in synaptic strength were larger than 20% of baseline recordings.

Behavioral studies

Auditory gating

The conditioning chamber (19 × 25 × 19 cm) was placed inside a sound-attenuating box (67 × 53 × 55 cm, StartFear System, Panlab, Spain) and was composed of black methacrylate walls, a transparent front door, a roof speaker and a grid floor (StartFear System, Panlab). Mice were placed on the grid floor in a small non-restraining plexiglas cylinder (5 × 10 × 3.5 cm) during 5 min prior to testing (acclimatation period). A background white noise (BWN, 65 dB) was present throughout testing. The acoustic startle reflex (ASR) was induced by a high-intensity startling tone (pulse; 55 dB above background noise, 10 kHz, 40 ms) and its amplitude was modulated by the presentation of non-startling low-intensity prepulses (0–12 dB above background noise, 10 kHz, 20 ms) to evaluate auditory gating. Startle responses were detected by a piezoelectric accelerometer plugged to the grid floor. The startle reflex was first evaluated by exposing mice to 4 blocks of 9 pulses (5, 15, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 dB above BWN) presented in a pseudo-random order with inter-trial intervals (ITIs) of 10, 15 or 20 s. On the next day, the capacity of a prepulse to reduce the amplitude of the startle reflex (prepulse inhibition of ASR, or PPI) was evaluated by exposing mice to 6 blocks of 5 pairs of stimuli each composed of one prepulse (0, 3, 6, 9 or 12 dB above BWN) delivered 100 ms before a startling pulse of 120 dB (55 dB above BWN).

Navigation and reversal learning in the water maze.

The maze was a circular tank (150 cm in diameter) filled with water (21–22°C) to 7 cm below the top of the sidewall, made opaque by addition of a white non-toxic paint (Opacifier 631, Morton SA, France). A circular escape platform (11 cm in diameter) was placed in the center of the maze during pre-training or in the center of a quadrant (40 cm from the wall) during training. The platform placed 0.5 cm below the water surface was not visible. The maze was placed in a well-lit room (380 lx) containing several extra-maze cues. A video camera mounted on the ceiling was connected to a computer in an adjacent room and data were recorded using the Any-Maze Video Tracking System (Stoelting, USA). One day before training the mice underwent four trials during which they were trained to find and stay on the escape platform for 60 s (pretraining). Then, the training phase lasted 9 days and consisted of 4 successive trials during which the platform was always located in the same quadrant for a given mouse. In each trial, the mouse was introduced in the water maze from three different starting points in the quadrants that did not contain the platform and was allowed to swim freely until it reached the platform. Mice failing to find the platform after 90 s were gently guided to it by hand and a maximum escape latency of 90 s was recorded. Mice remained 60 s on the platform before the start of the next trial. After the training phase, the platform was moved in the opposite quadrant and mice were given 5 additional days of training to learn the new platform position (reversal). Individual swim paths were recorded to calculate the swim speed, distance swum, time spent in various virtual areas of

the maze (the four quadrants, the four platform annuli representing putative platform positions, four extended annuli (48 cm in diameter) surrounding platform positions, and a virtual corridor 19 cm in width set along the wall to quantify thigmotaxis. Path efficiency was defined as an index of the path taken by the animal to get from its start position to the platform, with a score of 1 indicating perfect efficiency (straight line trajectory).

Reversal learning and working memory in the radial maze

The automated radial maze (Ugo Basile, Italia) had a central platform (16 cm in diameter) and eight arms (5.5 × 35 cm) with low-profile walls (height: 1 cm; initial step from door: 8 × 7 cm length) to optimize visibility of extra-maze cues for allocentric spatial orientation. A guillotine-like mechanism enabled to quickly but silently open and close individual sliding doors at the entrance of each arm. Independent groups of mice of both genotypes were submitted either to a win-stay learning paradigm to test reversal learning or to a win-shift paradigm to evaluate spatial working memory performance. Mice were first placed under a water restriction regimen with daily access to 0.2 ml of the solution to be used as the reward during training (Reversal testing: 0.1% saccharine solution ; DNMTTP: sweetened condensed milk diluted 1:1 in water) followed by access to 1 ml of water. Mice were maintained at 85–90% of their initial weight throughout the experiment. Mice were given 1 ml drinking water in their home cage after each session.

For reversal testing, mice were first allowed to freely explore the maze with all doors opened for two days, during which they could retrieve 3 (on day 1) or 1 (on day 2) 15- μ l drops of the reward solution in each arm (pretraining). Training then consisted in a 10-day training phase, during which mice had to retrieve one reward placed in a small cup at the end of one single baited arm, in 6 consecutive trials per day. Each trial started by placing mice on the central platform for 15 s before opening all doors and ended when the mouse reached the end of the baited arm and returned to the central platform after consuming the reinforcement, or after a maximum duration of 300 s. The baited arm was the same throughout this initial discrimination task for a given mouse. On day 11, the reward was moved to a new baited arm located 135° anticlockwise from the previously baited arm and the mice had to learn the new rewarded position for 4 days (reversal learning). Mice were returned to their home cage for 60 s between each trial. Reference memory errors were defined as first visits into non-baited arms and working memory errors as re-visits of non-baited arms within the same trial.

For working memory we first used a low-interference paradigm. Training lasted 7 days and consisted of 2 trials per day (Fig. S7 A). Each trial started by placing the mouse on the central platform before door opening. During a presentation phase, only 3 doors were opened to provide access to only three baited arms. Mice were then maintained on the central platform for 15 s before start of a choice phase during which six doors were simultaneously opened, giving access to the three previously baited arms and to three novel arms. Only the 3 novel arms were baited during the choice phase. On day 8, working memory performance was challenged by increasing the delay between the presentation and choice phases to 30 s instead of 15 s.

In a second experiment we analyzed working memory performance using a high-interference delayed non-matching to place task, or DNMTTP. Testing started with a pretraining

phase lasting 4 days during which the mice were given sequential access to each baited arm until the entire maze was visited within a single session. Then, DNMTTP consisted of 8 trials per day for 14 days. In each trial, the mouse could first sequentially visit two different baited arms (study phase). After entering the last arm and returning to the central platform for 5 s, it was then submitted to a choice phase consisting in two trials (two choice pairs) during which it had the choice to visit a new arm or an arm previously visited during the study phase. Only the new arm was baited and a visit to this arm was counted as a correct choice. For each choice pair, once the mouse had made a choice, the door of the other open arm was closed. The mouse first had simultaneous access to the first arm previously visited during the study phase and a new adjacent baited arm (first choice). Then, it was given access to the second arm previously visited during the presentation phase and a new adjacent baited arm (second choice). The sequences of presented arms during the study and choice phases were pseudo-randomly selected, as in [Touzani et al. \(2007\)](#). In each trial, the mouse was given a score equal to 100% if it only visited new baited arms during the choice phase, 50% if it visited one of the two new baited arms and 0% if incorrect choices were made in both trials.

Statistical analysis

Most data are expressed as mean \pm standard errors of the mean (SEMs). Genotype differences were evaluated using one or two-way ANOVAs depending on the presence of a within-subject repeated measure (intensity, time, training session); p values < 0.05 were considered statistically significant. Cumulative distributions of the amplitude of miniature currents in the patch-clamp study and of protein cluster size in confocal image analyses were compared using the Kolmogorov-Smirnov (K-S) test; p values < 0.005 were considered statistically significant.

Results

Neurophysiology of prefrontal cortex pyramidal neurons

Intrinsic membrane properties

Stable patch-clamp of pyramidal neurons was obtained in layer 5 of median prefrontal cortex (mPFC) in juvenile male mice of both genotypes (Fig. S1). Recordings displayed the typical intrinsic properties and firing patterns of regular spiking pyramidal neurons ([Mc Cormick et al, 1985](#); [Connors and Gutnick, 1990](#)). As shown in Table S1, passive membrane properties characterized by membrane resting potential (V_m), input resistance (R_i) and time constant (τ_m) were statistically comparable between genotypes (all three parameters, $p > 0.1$, NS). The action potential (AP) threshold was slightly higher in Dp71-null mice compared to WT ($\approx +2$ mV; $p < 0.05$), but this was not associated with significant changes in AP half width, dV/dt ratio and firing rate. Hence, the passive membrane properties as well as the rapid and balanced expression of inward and outward ionic conductances associated with action potential firing were largely preserved in mice lacking Dp71.

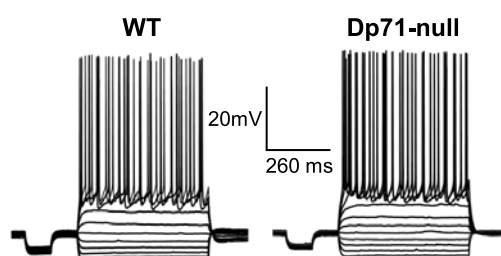


Fig. S1. Stable firing patterns of action potentials in layer 5 of median prefrontal cortex induced by injected currents in whole cell configuration and current clamp mode.

	V_m (mV)	R_i (M Ω)	τ_m (ms)	AP threshold (mV)	AP half width (ms)	AP amplitude (mV)	dV/dt ratio	Firing rate (AP/s/pA)
WT n = 32, 23 mice	-74.93 ± 1.83	421.94 ± 60	18.80 ± 1.17	-47.90 ± 0.68	1.73 ± 0.06	84.53 ± 1.75	-4.24 ± 0.15	64.19 ± 3.41
Dp71-null n = 48, 22 mice	-78.18 ± 1.39	363.36 ± 30	17.40 ± 1.00	-45.92 ± 0.66	1.62 ± 0.05	84.12 ± 1.66	-4.11 ± 0.16	75.59 ± 7.88
p	0.154995	0.341313	0.360136	0.040730	0.181306	0.868643	0.578876	0.224507

Table S1. Parameters reflecting active and passive membrane properties: resting potential (V_m), input resistance (R_i), time constant (τ_m), action potential (AP) threshold, AP amplitude, AP half width, dV/dt ratio (ratio of AP rising and fall-off slopes) and firing rate (mean linear slope of frequency/intensity curves).

Excitatory synapse organization and glutamatergic transmission

Synaptic expression of the postsynaptic density protein, PSD-95, was characterized as punctate immunofluorescent dots of different sizes (clusters) scattered in dendritic areas of principal cells in all cortical layers of mPFC (Fig. 1 A). There was a rightward shift of the distribution curves of PSD-95 cluster sizes in Dp71-null mice compared to WT mice (KS-test, $p < 0.005$), indicating a higher proportion of large protein clusters in Dp71-null mice, as previously reported in hippocampus of this model (Daoud et al., 2009b).

Basal synaptic transmission in layer 5 neurons of mPFC was first evaluated by constructing input/output curves reflecting the proportional increase in the evoked EPSC amplitude with increasing stimulus intensity (Fig. 1 B). The evoked EPSC amplitude was abnormally enhanced in Dp71-null mice at all stimulus intensities (7 cells; 4 mice) as compared to WT littermate mice (10 cells; 4 mice) ($p=0.0239$). The genotype difference was readily observable from the lowest stimulation intensity, suggesting a main involvement of AMPA receptor-dependent transmission. To test this hypothesis, we further investigated the two main components of glutamatergic neurotransmission mediated by the AMPA/kainate and NMDA receptors (AMPA_r, NMDA_r) (Fig. 1 C). Clamping the cell voltage at -75 mV in the presence of the GABA_A-receptor antagonist picrotoxin ($50\mu\text{M}$) enabled isolation of the fast AMPA_r-mediated inward current, which could be abolished by the AMPA_r antagonist NBQX ($10\mu\text{M}$). Then,

depolarizing the same cell to +40mV in the presence of picrotoxin and NBQX revealed a slower outward current that was blocked by the NMDAr antagonist D-AP5 (50 μ M), which therefore corresponded to the NMDAr-mediated component of neurotransmission. The ratio of NMDAr and AMPAr-dependent peak amplitudes (NMDA/AMPA ratio) was significantly reduced in Dp71-null mice compared to WT mice (Dp71-null: 0.39 ± 0.05 , n=14 cells; WT: 0.63 ± 0.05 , n=34 cells; $p=0.0135$; Fig. 1 C).

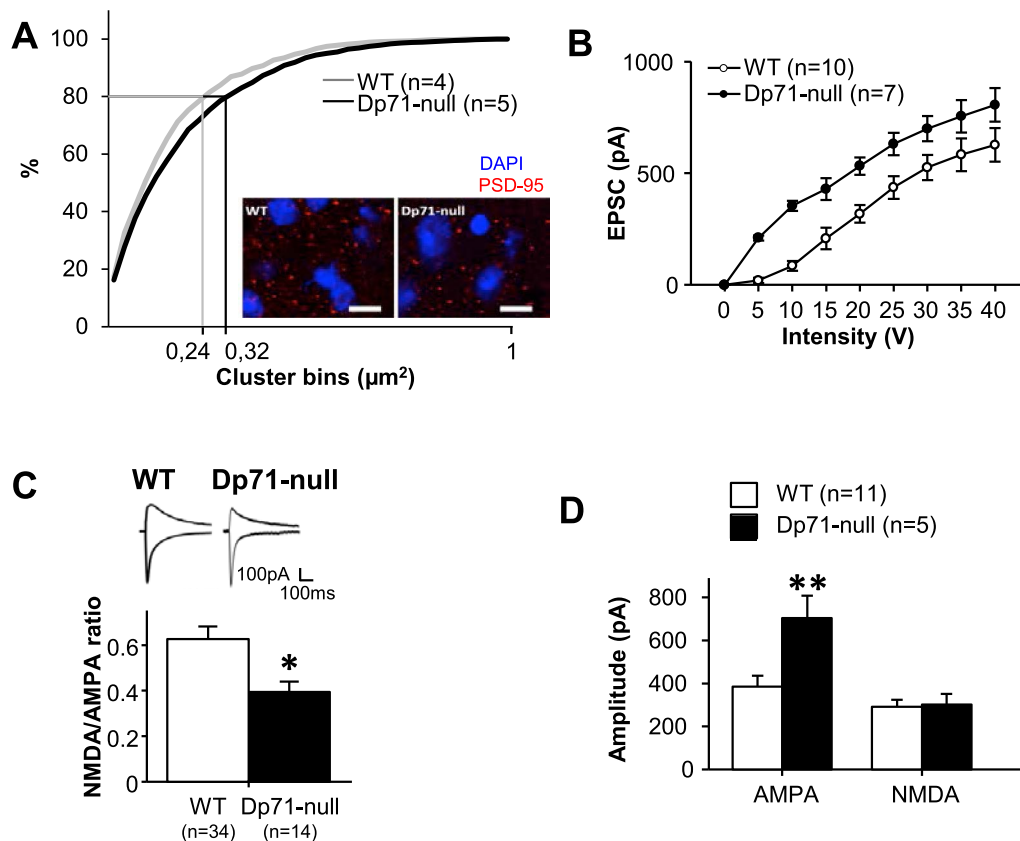


Fig. 1. Excitatory synapse organization and neurotransmission. **(A)** Immunoreactivity of PSD-95 in dendritic areas of mPFC. Cluster sizes were analyzed in a cumulative frequency curve. Inserts show raw sample confocal images of protein clusters (red) and neuron nuclei (blue) in each genotype. Scale bar: 10 μm . The distribution of PSD-95 clusters (0.05 to $1 \mu\text{m}^2$) showed a rightward shift in Dp71-null mice, with 80% of clusters $\leq 0.24 \mu\text{m}^2$ in WT mice (n=4) versus 80% $\leq 0.32 \mu\text{m}^2$ in Dp71-null mice (n=5). **(B)** Input-output curve showing the amplitude of EPSCs recorded in layer 5 mPFC neurons following low-frequency subthreshold electrical stimulation in layer 2/3 at various intensities. **(C)** Reduced NMDA/AMPA current ratio in Dp71-null mice. Sample traces show AMPAr-mediated (downward trace) and NMDAr-mediated (upward trace) synaptic currents averaged from a series of 10 consecutive evoked EPSCs. **(D)** In a subset of neurons in which the NMDAr component of EPSCs was comparable between genotypes, the amplitude of AMPAr-mediated currents was increased in Dp71-null mice compared to WT mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, genotype effect.

As shown in Fig. 1 D, in a subgroup of cells in which NMDAR-mediated current amplitudes were closely comparable between genotypes, the AMPAR-mediated currents were significantly increased in cells from Dp71-null mice (702.8 ± 105 pA; $n = 5$) compared to WT mice (385.45 ± 50.88 pA; $n = 5$) ($p < 0.008$).

Presynaptic and postsynaptic components of neurotransmission

Spontaneous action potential-independent (TTX-insensitive) miniature currents were studied to decipher putative alterations of presynaptic and postsynaptic mechanisms involved in quantal neurotransmission and to assess a possible reduction in inhibitory (GABAergic) transmission. The distribution of inter-event intervals (frequency) and peak amplitudes of miniature EPSCs (mEPSCs; first 300 events; $n=11$ cells per genotype) and mIPSCs (first 300 events; $n=25$ cells in Dp71-null mice and 20 cells in WT mice) were analyzed as cumulative plots normalized to maximal values (Fig. 2).

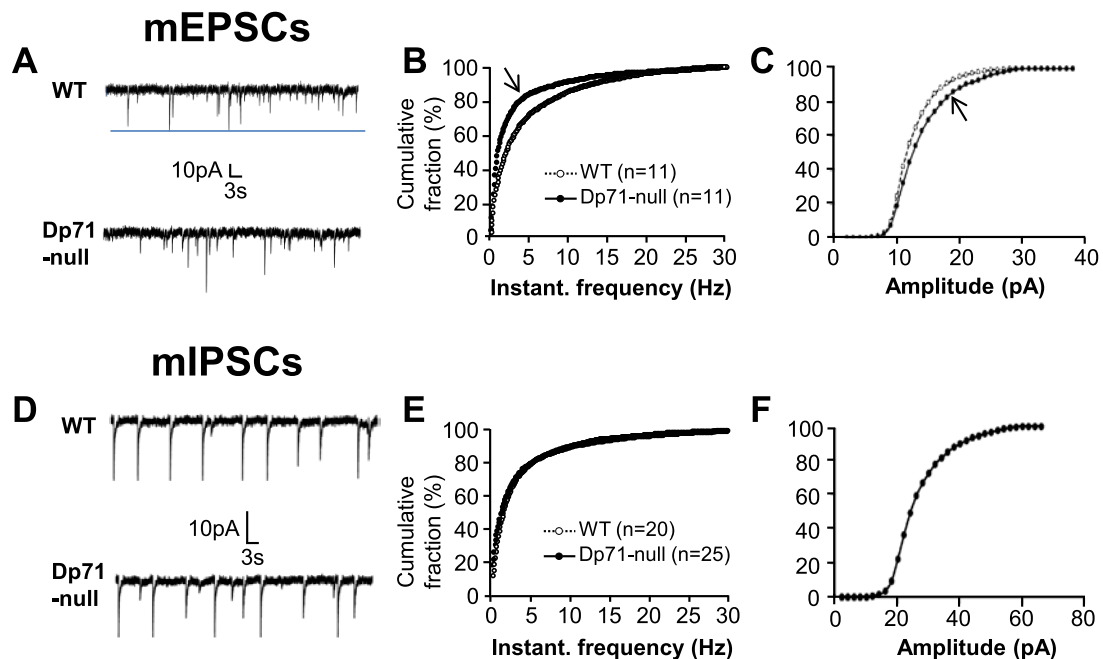


Fig. 2. Spontaneous miniature excitatory and inhibitory currents. **(A)** Representative traces of mEPSCs recorded at holding potential of -75 mV in presence of TTX, D-AP5 and picrotoxin. **(B-C)** Cumulative fraction plots of instantaneous frequencies and peak amplitudes of mEPSCs. Arrows show the leftward shift in frequencies and rightward shift in amplitudes in Dp71-null mice. **(D)** Representative traces of mIPSCs recorded at holding potential of -75 mV in presence of TTX, D-AP5 and NBQX. **(E-F)** Cumulative fraction plots of instantaneous frequencies and peak amplitudes of mIPSCs.

The frequency of miniature events accounts for presynaptic mechanisms while their amplitude reflects postsynaptic parameters. For mEPSCs frequency (Fig. 2B), there was a leftward shift of the cumulative plot toward smaller frequencies in Dp71-null mice ($p < 0.0001$), reflecting a lower probability of glutamate release in this transgenic model. However, there was a

shift towards larger values in the distribution of peak amplitudes in Dp71-null mice ($p < 0.0001$; Fig. 2C), suggesting an increase in the sensitivity of their postsynaptic glutamate receptors. While the rise time of mEPSCs was comparable between genotypes (WT: $\tau_{on} = 2.47 \pm 0.09$ ms; Dp71-null: $\tau_{on} = 2.59 \pm 0.05$ ms; $n > 100$ events in 6 cells in both genotypes; $p = 0.3133$; Fig. S2), the decay time constant was significantly smaller in the mutants (WT: $\tau_{off} = 6.69 \pm 0.15$ ms; Dp71-null: $\tau_{off} = 5.6 \pm 0.16$ ms, $p < 0.0001$; Fig. S2), suggesting a putative change in AMPAR properties and/or subunit composition. In contrast, the frequency and amplitude of mIPSCs were strictly comparable between genotypes (Fig. 2 D-F), as well as mIPSCs kinetics (not shown), thus indicating that GABAergic neurotransmission was unaltered in Dp71-null mice.

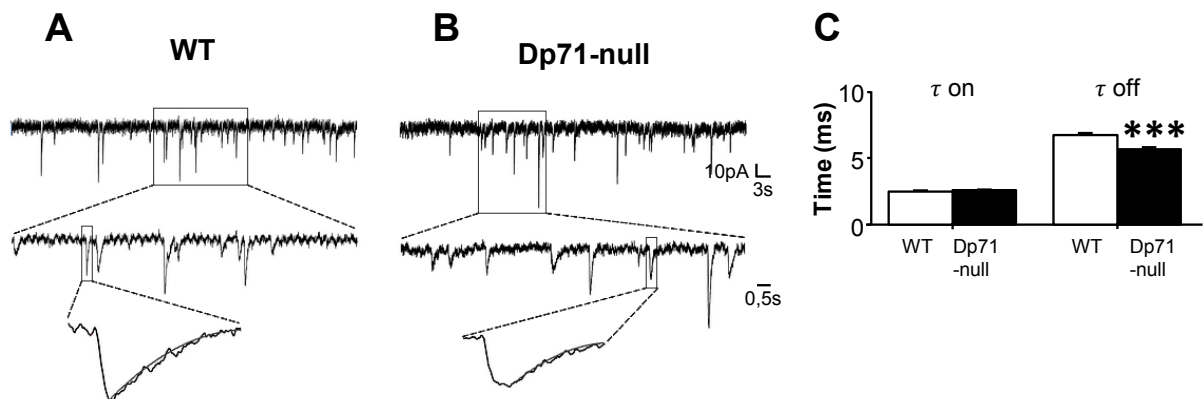


Fig. S2. (A-B) Representative traces of mEPSCs recorded in WT **(A)** and Dp71-null mice **(B)** at holding potential of -75 mV, in presence of TTX, D-AP5 and picrotoxin. Successive traces from top to bottom in A and B show increasing magnification of time and amplitude scales of miniature events. **(C)** Rise time (τ_{on}) and decay time (τ_{off}) of mEPSCs, showing significant reduction of decay time in Dp71-null mice compared WT mice ($n = 6$ per genotype). *** $p < 0.001$, genotype effect.

Excitatory/inhibitory (E/I) balance

The relative contribution of excitatory and inhibitory currents to cortical synaptic balance in Dp71-null and WT mice was estimated through deconvolution of the composite synaptic currents recorded in layer 5 pyramidal neurons which are critically involved in the elaboration of balanced cortical outputs. We first performed the extraction of the evoked total input synaptic conductance g_T (Fig. S3) followed by its deconvolution to determine the somatic excitatory g_E and inhibitory g_I input conductances (Fig. 3 A-B). Typically, electric stimulations in layer 2/3 produced a fast excitatory conductance (g_E) followed by a long lasting inhibitory conductance (g_I) in layer 5 neurons (Le Roux *et al*, 2006). The integrals of g_E (Intg E) and g_I (Intg I) calculated from a 200 ms recording period were then expressed as percent of the total conductance integral (Intg T) to represent the E/I ratio (Monier *et al*, 2008; Moreau *et al*, 2013; Meunier *et al*, 2013). The E/I ratio was not correlated to conductance amplitude and independent from stimulation amplitude.

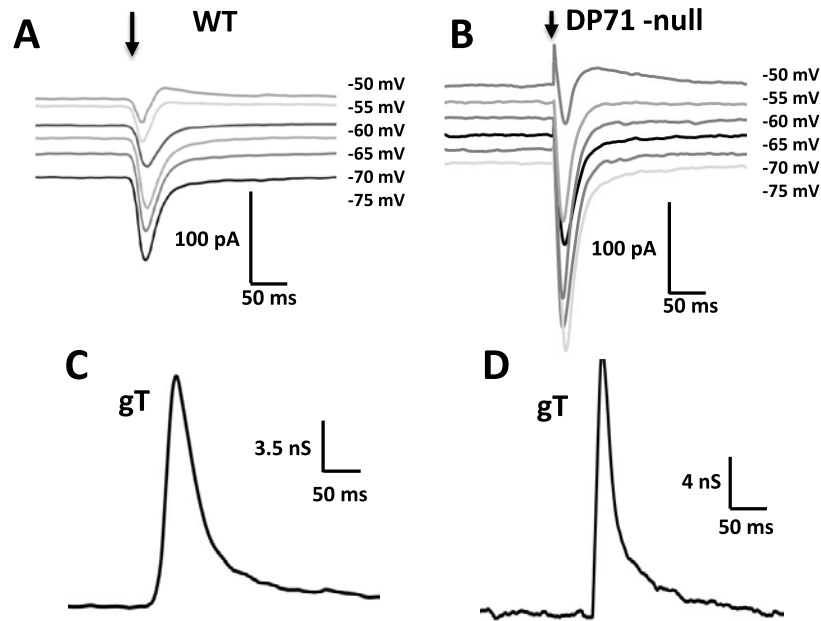


Fig. S3. (A-B) Sample traces showing typical recordings of composite currents evoked in layer 5 mPFC neurons in WT **(A)** and Dp71-null mice **(B)** following low-frequency subthreshold stimulation of layer 2/3 at various holding potentials. Vertical arrows indicate onset of electrical stimulation. **(C-D)** Post-processing conductance analysis enabled extraction of total conductance (gT) changes.

As shown in Fig. 3 C-D, the E/I ratio was significantly altered in Dp71-null mice (n=33 cells in 12 mice) compared to WT littermate mice (n=29 cells in 12 animals). The WT mice exhibited 18% excitation and 82% inhibition whereas the E/I balance was clearly skewed toward enhanced excitation in Dp71-null mice (26%/74%) (Fig. 3 C). The E/I ratio was therefore significantly increased in Dp71-null mice (ratio = 0.33) compared to WT mice (ratio = 0.225) ($p=0.0042$; Fig. 3 D), suggesting alterations of excitatory networks homeostatic functions in mice lacking Dp71.

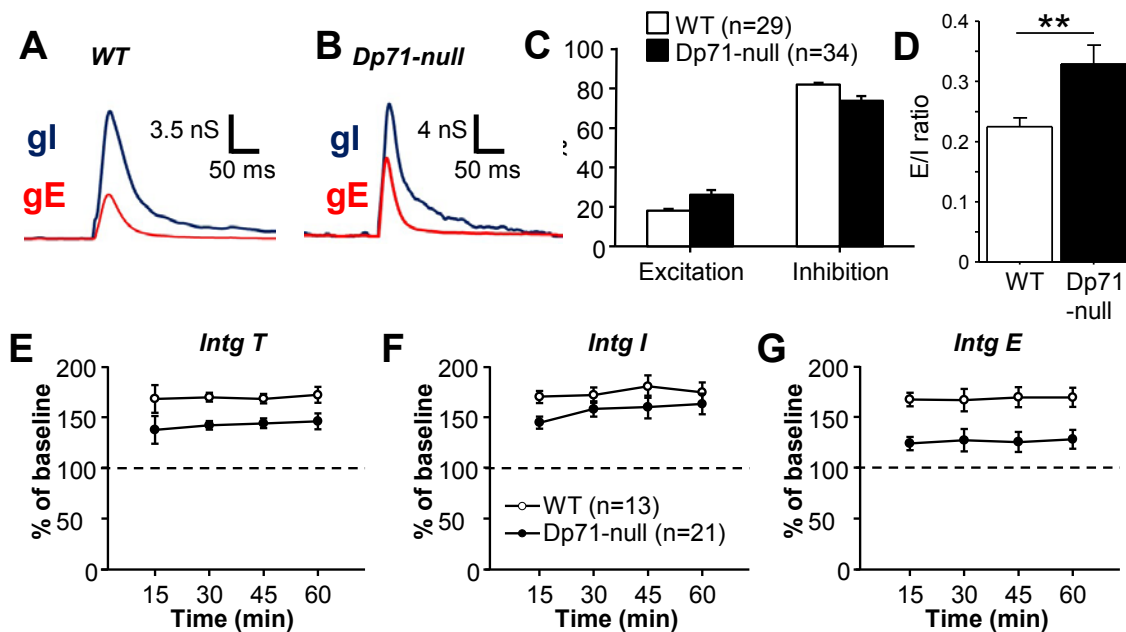


Fig. 3. Excitatory/inhibitory (E/I) balance and synaptic plasticity in mPFC neurons. **(A-B)** Sample traces from WT **(A)** and Dp71-null mice **(B)** showing somatic excitatory (gE) and inhibitory (gl) input conductances extracted by deconvolution. **(C)** Percentage of excitation and inhibition diverged between genotype, with a shift toward enhanced excitation in Dp71-null mice. Synaptic conductance changes were evaluated by the ratio of their integral values (intgE or intgl) to that of global conductance changes (intgT, Fig. S3). **(D)** Histogram showing the consequent enhancement of the E/I ratio in Dp71-null mice. * $p < 0.01$, genotype effect. **(E-G)** Long-term potentiation (LTP) of synaptic transmission was characterized by an increase in total integrated conductance Intg T **(E)** with overt potentiation of both inhibitory intgl **(F)** and excitatory intgE **(G)** components of this composite total conductance. LTP of Intg T and Intg E was significantly reduced in Dp71-null mice, while the level of potentiation of inhibitory inputs was comparable between genotypes.

Synaptic plasticity

Synaptic plasticity was induced by high frequency stimulation with a theta burst protocol (TBS) and was expressed as the percent change in the integral total (intg T), inhibitory (Intg I) and excitatory (Intg E) conductances compared to baseline recordings. As expected from previous studies (Meunier et al., 2013; 2015), TBS resulted in the induction of either long-term potentiation of synaptic transmission (LTP), long-term depression (LTD) or absence of plasticity (% change from baseline $< 20\%$). The proportion of each event was comparable between genotypes, with LTP being the most represented form of plasticity (Fig. S4 A). In WT mice, LTP was characterized by a strong and lasting potentiation of the total (composite) synaptic response (Fig. 3 E), with a comparable potentiation of both inhibitory and excitatory currents (Fig. 3 F and 3 G, respectively). In Dp71-null mice, however, the potentiation of the composite current was significantly reduced as compared to WT mice (Dp71-null: $43 \pm 3.9\%$, $n=21$; WT: $67 \pm 4.6\%$, $n=13$; $p=0.00046$; Fig. 3 D). This was associated with a reduced potentiation of the excitatory

component (Intg E) in Dp71-null mice (only +27%) compared to WT mice (+68%) ($p=0.0006$; Fig. 3 G). The level of potentiation of the inhibitory component (Intg I) was also lower in Dp71-null mice but this did not reach the level of significance ($p = 0.1$, NS; Fig. 3 F). As expected from previous studies (Meunier et al., 2013; 2015), depression (LTD) of the composite synaptic response was only observed in few cells and no significant genotype differences could be detected (Fig. S4 B).

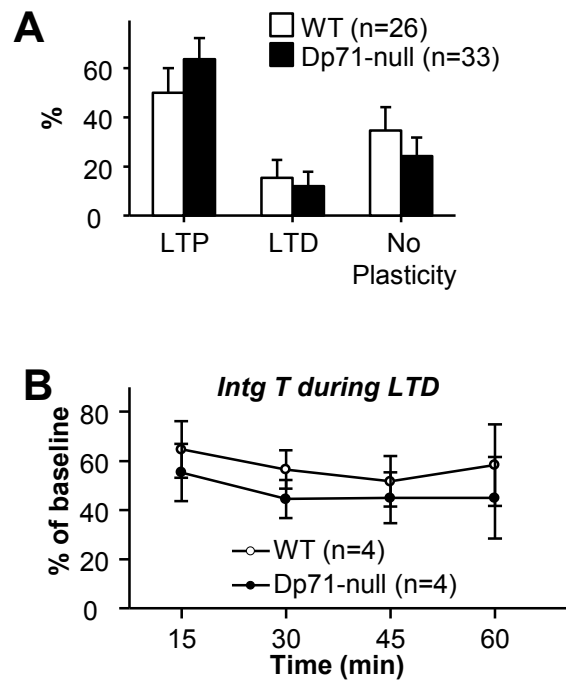


Fig. S4. (A) Distribution of neuronal cells expressing LTP, LTD or no plasticity following theta burst stimulation, as a percent of total number of recorded neurons. **(B)** Level of potentiation in the neurons that expressed LTD, expressed as percent change of Intg T during the 60 min recordings following TBS.

The short-term presynaptic facilitation of neurotransmission (Zucker and Regehr 2002; Katz and Miledi 1968) was tested by stimulating at subthreshold intensities in layer 2/3 with paired pulses with variable interstimulus intervals (ISI) (Fig. S5). Paired-pulse facilitation (PPF) of EPSCs was observed in both genotypes (Fig. S5 A); it was maximal at the shortest delay (50ms) and decreased to baseline levels for increasing duration of the intervals, thus confirming typical dependence of PPF on the ISI. There was no statistical difference between genotypes on the level PPF expressed at different ISIs (Fig. S5 B), indicating that the absence of Dp71 did not alter the calcium-dependent presynaptic mechanisms involved in glutamate release.

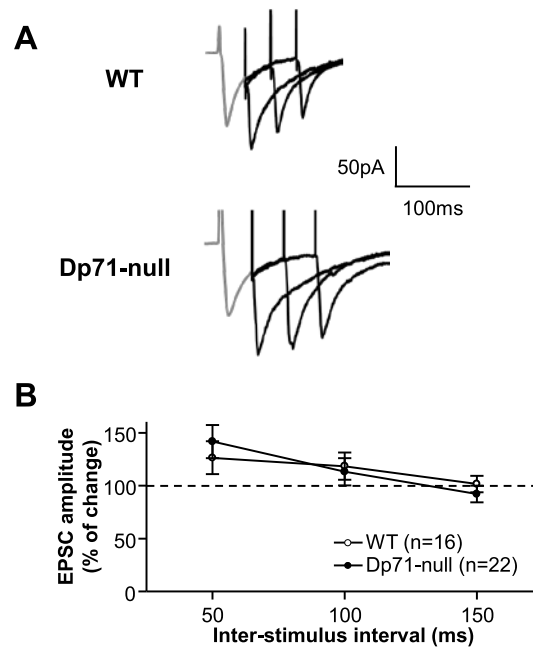


Fig. S5. Paired-pulse short-term facilitation. **(A)** Superposition of sample traces showing EPSCs evoked at a holding potential of -75mV across increasing inter-stimulus intervals (ISI) of 50, 100, and 150 ms. Stimulation intensity corresponded to 1/3 of the intensity eliciting an action potential. The grey trace corresponds to the average of the response induced by the first pulse in each recording. **(B)** Evoked EPSP amplitudes as a function of ISI, expressed as per cent change from amplitude recorded in response to the first pulse.

We further induced LTP with the same protocol after having pharmacologically isolated AMPAR-mediated and NMDAR-mediated EPSCs, as described above. As shown in Fig. S6 A, the expression of AMPAR-mediated LTP was altered in the Dp71-null mice (genotype \times time interaction: $p < 0.003$), with a significantly reduced magnitude as compared to WT mice 60 min after LTP induction ($p < 0.04$). As previously described by others (Meunier et al., 2015), a strong potentiation of the NMDAR-mediated EPSCs ($\approx 150\%$) could also be obtained following theta-burst stimulation (Fig. S6 B). This LTP of NMDA-mediated EPSCs was comparable between genotypes ($p > 0.3$, NS; Fig. S6 B), thus supporting the hypothesis that selective changes in AMPAR functions account for alterations in excitatory synaptic transmission and plasticity in Dp71-null mice.

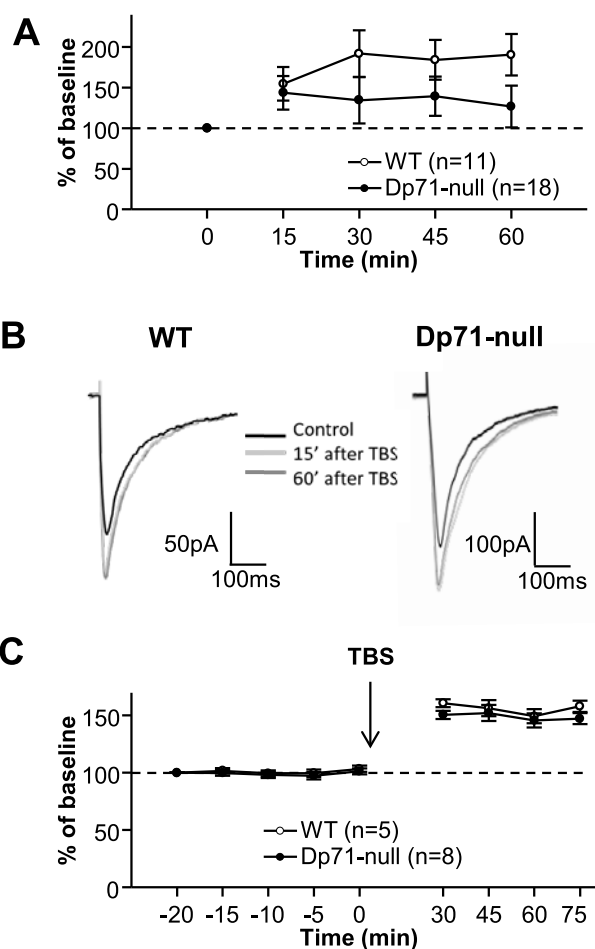


Fig. S6. AMPAR-mediated and NMDAR-mediated LTP. **(A)** LTP of AMPAR-dependent EPSCs was lower in Dp71-null mice. **(B)** Sample traces (average of 6 responses) illustrating potentiation (grey traces, recordings made 15 min and 60 min after TBS) of NMDAR-dependent currents following TBS, as compared to baseline recordings (black trace). Recordings were obtained from pyramidal neurons at -50 mV in presence of NBQX and picrotoxin. **(C)** Time course of NMDAR-mediated LTP showing stable baseline recordings before TBS and LTP expressed as percent of baseline from 30 to 75 min following TBS.

Sensory processing and executive functions

Sensory gating

The capacity to efficiently integrate and gate auditory stimuli was addressed using a paradigm based on inhibition of the startle reflex. We first quantified the amplitude of the startle reflex elicited by increasing pulse intensities ranging from 5 to 55 dB above the 65dB background noise. As shown in Fig. 4 A, there was no significant difference between genotypes (Genotype: $p > 0.1$, genotype \times intensity interaction: $p > 0.1$) showing that the startle reflex was not impaired in Dp71-null mice. Latencies of startle responses were also unaffected (Genotype: $p > 0.7$, genotype \times intensity interaction: $p > 0.7$; not shown). Moreover, the 120-dB pulses (55 dB above background) presented at the beginning (priming) and end (ending) of the experiment elicited comparable

responses in both genotypes (priming vs ending amplitudes: $p > 0.3$; Fig. 4 A), indicating that the maximal startle response does not show notable variation over the course of an experiment. In a second experiment, a non-startling prepulse (3–12 dB above the 65 dB background noise) was delivered 100 ms before the 120 dB startling pulse (Fig. 4 B). This induced a progressive decrease in startle amplitude as a function of prepulse intensity ($p < 0.001$), i.e., a prepulse-induced inhibition (PPI) of the startle response. The percent decrease in the startle response was comparable between genotypes for all prepulse intensities ($p > 0.8$), thus showing that auditory sensory gating was not altered in Dp71-null mice.

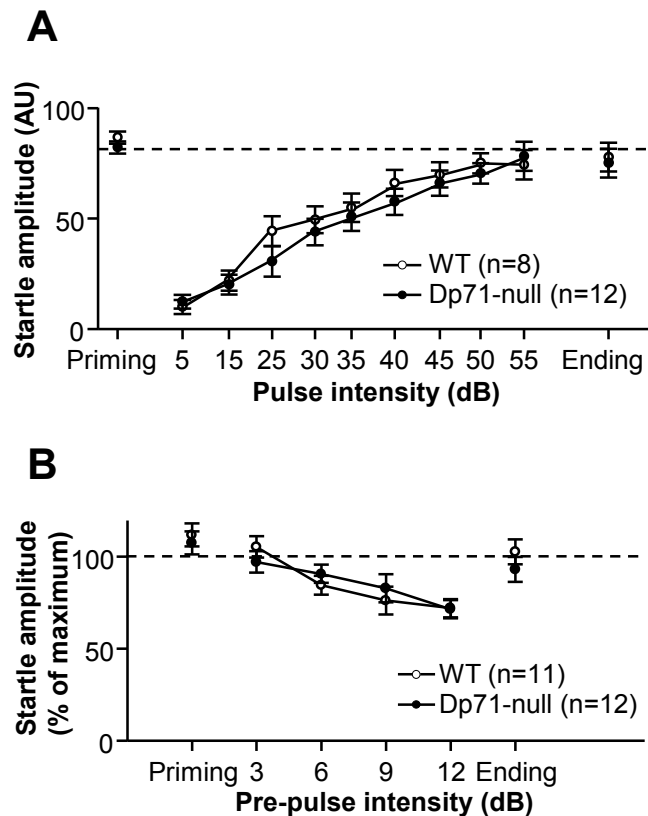


Fig. 4. Gating of auditory stimuli. **(A)** Startle reflex expressed in arbitrary units as a function of auditory pulse intensity (from 5 to 55 dB above BWN). **(B)** Prepulse inhibition of the acoustic startle reflex (PPI) expressed as the amplitude of the startle in response to the startling pulse (55 dB) when preceded by a prepulse of 3, 6, 9 or 12 dB above background. Data are normalized to the maximal amplitude recorded in the absence of prepulse. (A-B) Priming and ending pulses (average of 3 pulses) were applied at 120 dB (55 dB above background) to verify stability of the maximal startle response before and after application of the pulse ramp.

Spatial cognitive flexibility

To address cognitive flexibility, mice were first trained in a spatial reference memory task followed by reversal learning in a water maze (Fig. 5 A–B). During the first 8 days of the training phase, the Dp71-null mice swam longer distances (Fig. 5 A) and displayed longer latencies (not shown) to reach the platform and escape from water as compared to WT littermate mice (both

parameters: $p < 0.05$). This was associated with a reduced path efficiency in the transgenic mice ($p < 0.05$; Fig. 5B). However, there was no main genotype effect on swim speed or thigmotaxis (both parameters, $p > 0.1$), suggesting that the altered progression of learning performance in Dp71-null mice was not influenced by non-cognitive factors. Upon reversal on day 10 (platform position change), the WT mice showed a drop in performance characterized by a longer distance swum to the platform and decreased path efficiency as compared to the last day of training. During the next 3 days, the WT mice showed a progressive decrease in the distance swum to reach the new platform position ($p < 0.02$; Fig. 5 A) and in the number of entries into the quadrant that previously contained the platform ($p < 0.01$; not shown). Within the four days of reversal the performance reflected by these parameters returned to levels comparable with those expressed at the end of the initial training period, thus showing that the WT mice flexibly learned the new platform position. However, a significant genotype \times session interaction was detected during reversal learning (distance swum: $p < 0.03$; entries in quadrant previously containing platform: $p = 0.05$). This reflected a lack of performance improvement in the Dp71-null mice (both parameters, $p > 0.6$, NS), suggesting inflexible use of non-spatial navigation strategies.

Spatial cognitive flexibility was further assessed in a radial maze using a win-stay paradigm in which only one arm was baited (always the same for a given mouse) during the 10 days of initial training (acquisition; 6 trials per day). Reversal learning was then tested during 4 days during which the bait was moved to a different arm. In this task, mice of both genotypes showed comparable performance during pretraining (latency to visit the first arm: $p > 0.7$; number of arms visited: $p > 0.8$; not shown) and latencies of the first visit remained stable throughout the experiment ($p > 0.05$) and comparable in the two genotypes ($p > 0.4$). During the training phase, both genotypes rapidly mastered the task and displayed comparable reference and working memory performance across sessions ($p > 0.3$, Fig. 5 C-D). Upon reversal (day 11), the number of reference and working memory errors drastically increased in both Dp71-null mice and WT (genotype effect: $p > 0.4$). However, the progression of reference memory performance during reversal learning was significantly delayed in Dp71-null mice compared to WT mice (genotype \times session interaction: $p < 0.007$), as the transgenic mice made more reference memory errors (genotype effect, reference memory errors: $p < 0.002$; Fig. 5 C) and more visits in the incorrect arm that was previously baited during initial training ($p < 0.02$, not shown) during the second day of reversal learning, suggesting altered spatial cognitive flexibility.

Spatial working memory

Working memory performance was first assessed in a low-interference win-shift paradigm (Fig. S7 A). During training (7 days, 2 trials per day), the number of re-entries into visited arms during the presentation phase (access to 3 baited arms) was comparable between genotypes (Fig. S7 B). During the choice phase (Fig. S7 C), the number of visits of non-baited arms (i.e., arms previously explored during the presentation phase) was also comparable between genotypes. When working memory performance was challenged by increasing the delay between

the presentation and choice phases to 30 s instead of 15 s (delay test; day 8), no significant difference was detected between genotypes (Fig. S7 B-C).

In the high-interference delayed non-matching to place task (DNMTP), mice were sequentially submitted to two choice pairs between a recently visited arm and a new adjacent arm (Fig. 5 E). During each trial, only the visits to a new arm allowed the mice to retrieve a reward (correct choices). As shown in Fig. 5 F, the percent of correct choices increased across daily sessions in both genotypes (session effect: $p < 0.001$; genotype x session interaction: $p > 0.5$, NS), thus reflecting acquisition of the learning rule. However, the percent of correct choices was constantly reduced in Dp71-null mice throughout the learning period (genotype effect: $p < 0.003$), suggesting persistent impairment in working memory performance. Figure 5 G shows that this deficit was expressed during each choice trial (Genotype effect, first choice: $p < 0.006$; second choice: $p < 0.02$).

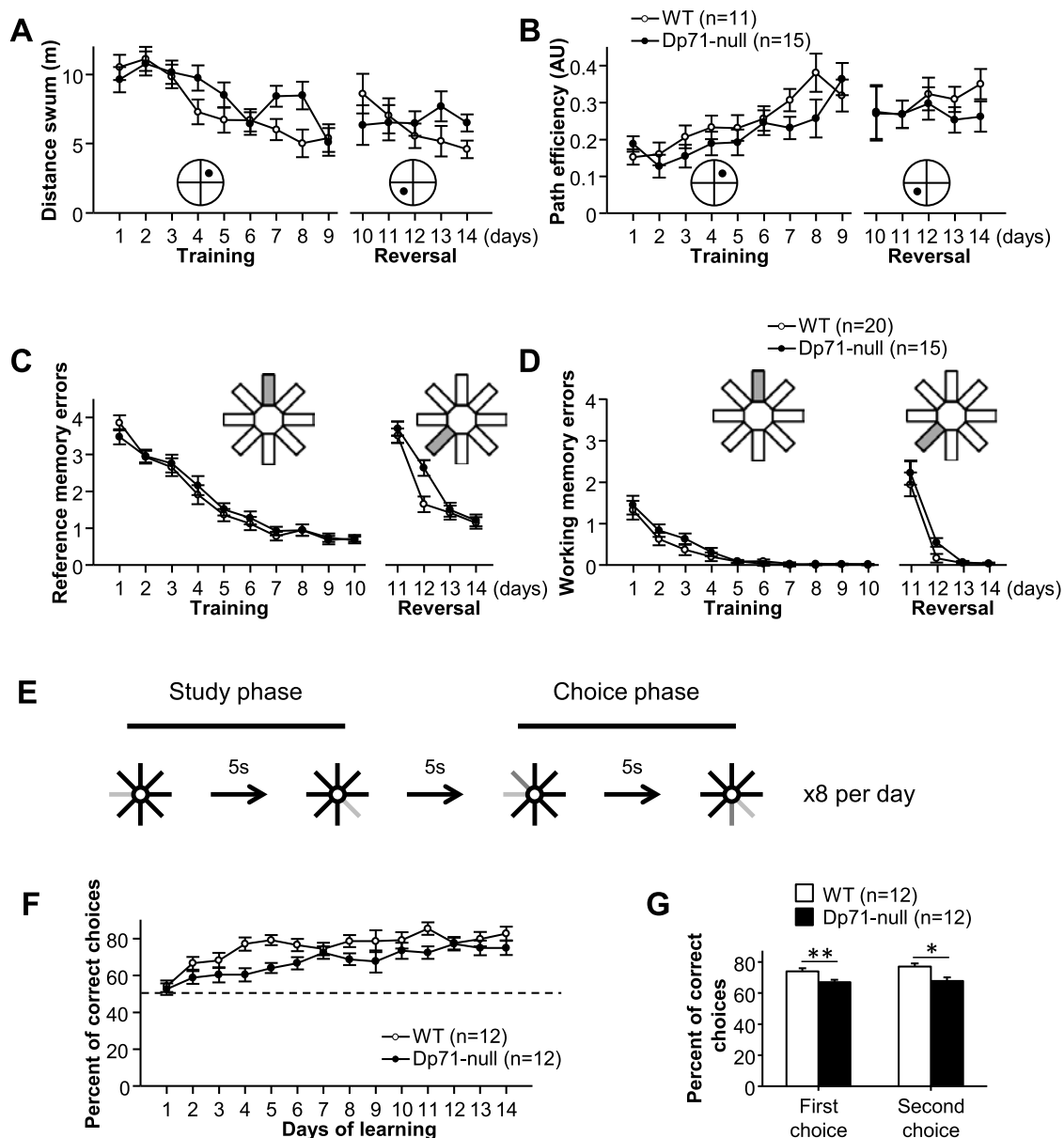


Fig. 5. Spatial cognitive flexibility and working memory. **(A–B)** Performance during spatial learning (days 1–9) and reversal (days 10–14; platform moved to opposite quadrant as shown in insets) in the water maze task, expressed as distance swum to platform **(A)** and navigation path efficiency **(B)**. **(C–D)** Performance during spatial learning (days 1–10) and reversal (days 11–14; baited arm moved 135° anticlockwise as shown in insets) in the radial-arm maze, expressed as reference memory **(C)** and working memory errors **(D)**. **(E–G)** Delayed non-matching to place. The drawing **(E)** shows the protocol composed of a study phase during which mice have sequential access to two arms (light grey arms) with 5-s intervals between trials, followed by a choice phase with sequential access to two set of arms, including one already visited during the study phase 2 and a new baited arm (dark grey arms). **(F)** Spatial working memory performance recorded during 14 days expressed as the percent of correct choices (entering the new baited arm). **(G)** Mean percent of correct choices performed during the first or second choice between sets of two arms. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, genotype effect.

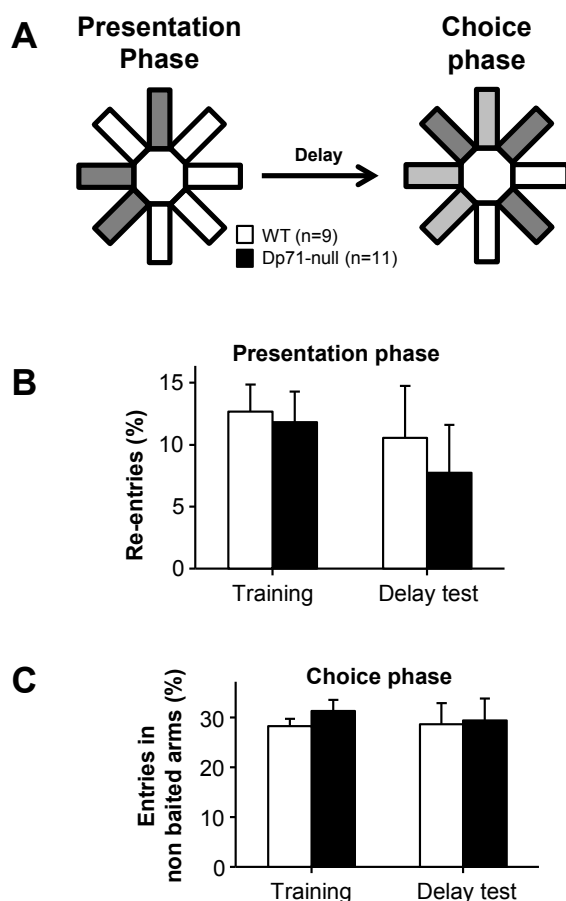


Fig. S7. Low-interference spatial working memory task in a radial maze. **(A)** Schematic representation of the protocol in which each trial was composed a presentation phase with access to 3 baited arms (grey arms in this example), followed by a choice phase with access to 6 arms among which only the 3 novel arms were baited. **(B)** Number of re-entries into already visited arms during the presentation phase of the training period (mean of 7 training days) and during day 8 when delay was increased to 30s instead of 15s. **(C)** Number of entries in non-baited arms (error) during the choice phase of the training period (mean of 7 days) and during day 8 when delay was increased to 30s instead of 15s.

Discussion

The major finding of this study is that a genetic loss of Dp71 dystrophin is associated with an excitatory/inhibitory (E/I) imbalance towards enhanced excitation in medial prefrontal cortex (mPFC) neuronal networks, associated with altered executive functions that depend on prefrontal cortex integrity. A role for Dp71 dystrophin in neuronal excitability was suspected because of its role in clustering aquaporin 4 water channels and Kir4.1 potassium channels in perivascular endfeet, suggesting that its loss could alter brain water homeostasis and increase extracellular potassium concentration with a putative impact on neuronal firing processes (Tadayoni et al., 2012; Hendriksen et al., 2015; for reviews). Dp71 has also been detected in neurons (Gorecki and Barnard, 1995; Aleman et al., 2001) and in postsynaptic densities (Blake et al., 1999; Daoud

et al., 2009b), while an alternative transcript called Dp40 has also been proposed to play a role in presynaptic and/or postsynaptic mechanisms in central excitatory synapses (Tozawa et al., 2012; Fujimoto et al., 2014). Hence the idea that Dp71 may have multifarious functions in both neuronal and glial cells. The precise molecular mechanisms by which absence of Dp71 alters neuronal function remain to be specified, but one main deteriorated system in the Dp71-deficient brain appears to be the regulation of E/I balance, neurotransmission and synaptic plasticity of neuronal networks involved in cognitive and executive processes.

Cortical synaptic E/I balance results from coordinated and regulated activities of recurrent excitatory and inhibitory cortical networks. Pioneer studies demonstrated that a rigorous estimation of the E/I balance can be obtained through decomposition of cumulative synaptic conductances, rather than through pharmacological isolation of inhibitory and excitatory currents. The E/I balance is normally finely tuned to a 20–80% set point in rodents and small shifts may have important impact on neuronal network activity (Le Roux et al., 2006, 2007, 2008; Meunier et al., 2013). Here we report that an 8% increase in excitation in Dp71-null mice, corresponding to 46% increase of the E/I ratio, is associated with a strong enhancement of basal excitatory current amplitudes and significant reduction of the level of synaptic plasticity (LTP) in prefrontal cortical networks. This change could not be attributed to any modification of neuron membrane passive properties. However, we found that Dp71 loss selectively alters the AMPA receptor-mediated component of fast glutamatergic transmission in mPFC, whereas NMDA-receptor currents are not significantly modified. This is at variance with the data obtained in hippocampal slices, in which both components were affected (Daoud et al., 2009b), suggesting that distinct adaptive mechanisms may take place in different brain structures in the absence of Dp71. Analyses of spontaneous quantal synaptic currents showed that GABAergic inhibitory transmission is unaltered and could not be responsible for enhanced excitatory transmission. The frequency of quantal excitatory events was reduced in Dp71-null mice, suggesting reduced probability of presynaptic glutamate release. This may result from a reduced number of functional glutamatergic synapses and/or alterations in presynaptic ultrastructure and glutamate release mechanisms (Daoud et al., 2009b ; Miranda et al., 2011; Tozawa et al., 2012). However, this reduced probability of glutamate release could not explain the enhanced excitation observed in Dp71-null mice. In contrast, we found that the amplitude of postsynaptic AMPA receptor currents was significantly increased, as well as the amplitude of quantal excitatory currents. A presynaptic origin cannot be ruled out, especially since an increase in presynaptic vesicle size has been reported in hippocampal excitatory synapses of this model, suggesting a pitative increase in glutamate vesicular content (Miranda et al., 2011). However, postsynaptic alterations, such as changes in the density of postsynaptic AMPA receptors, may also likely contribute to the enhanced excitation in Dp71-null mice. Moreover, we report here that the decay time constant of AMPAR-mediated mEPSC is reduced in Dp71-null mice, suggesting changes in AMPA receptor properties and/or subunit composition (Greger et al., 2007; Howe, 2015). The presence of larger clusters of the postsynaptic protein PSD-95 in confocal image analyses also favors a main impact on postsynaptic mechanisms (Losi et al, 2003). This is reminiscent of our previous study of glutamatergic synapses and hippocampal neurophysiology in Dp71-null mice (Daoud et al.,

2009b; Miranda et al., 2011), in which we proposed a role for Dp71 in regulating glutamate receptor clustering and/or organizing signaling cascades in postsynaptic densities. The present data also demonstrate that altered glutamatergic synapse organization and function leading to enhanced excitation is a main and reliable outcome in the Dp71-deficient brain.

Long-term potentiation of mPFC synaptic transmission following theta-burst stimulation was significantly reduced in principal neurons of Dp71-null mice. This deficit selectively affected the AMPA-receptor component of neurotransmission, while potentiation of the NMDA-receptor component and that of inhibitory inputs were comparable to the levels measured in WT mice. In contrast, paired-pulse facilitation, a short-lasting form of plasticity mediated in part by presynaptic mechanisms (Thomson et al., 2000), was unaffected. This suggests that the reduced magnitude of plasticity in Dp71-null mice was mostly due to deficient postsynaptic mechanisms. Besides, it is known that theta-burst stimulation of mPFC networks may not trigger plasticity or even induce LTD in a subpopulation of neurons, which is believed to depend on specific neuromodulatory processes by cortical or subcortical afferences (Meunier et al., 2013; 2015). Here, the proportion of cells expressing LTP, LTD, or a lack of plasticity was comparable between genotypes, suggesting unaltered connectivity to neuromodulatory circuits. The E/I balance was stable after induction of LTP in both genotypes, suggesting that its homeostatic regulation was preserved in absence of Dp71 and still able to dynamically adjust synaptic strengths in the correct direction to promote stability (Turrigiano and Nelson, 2004). We suggest that Dp71 loss induced structural changes during neuronal network development, such as abnormal architectural structuring of synaptic connections within excitatory microcircuits and putative changes in excitatory synapse molecular organization and morphology (Daoud et al., 2009b; Miranda et al., 2011), leading to enhanced neuronal excitability and modification of the stable range level of the balance between excitatory and inhibitory inputs. If the large enhancement of excitatory transmission relies on altered AMPA-receptor density, the reduced magnitude of LTP might result from a reduced capacity for fast mobilization of a more important number of these receptors to stabilize synaptic strengthening during plasticity. However, specific studies will be needed to confirm this hypothesis.

Synaptic plasticity and E/I balance are critical factors required for the fine-tuning of neuronal circuits, networks oscillations and homeostatic plasticity (Fritschy, 2008; Pozo and Goda, 2010). Recent studies highlighted that an elevation of the E/I ratio in mPFC may be a contributing pathophysiological factor in neurodevelopmental disorders such as autism, schizophrenia and intellectual disability. These diseases frequently come along with working memory, executive-function and social deficits, which have also been associated with PFC dysfunction with elevation of E/I balance (Gato and Broadie, 2010; Vinkers et al., 2010; Yizhar et al., 2011). Several clinical studies pointed to such high-order cognitive processing dysfunctions as a general finding in studies of cognition in DMD patients, likely central for their general intellectual functioning (Mento et al., 2011; Snow et al., 2013). However, no study had specifically addressed mPFC functions in animal models of this disease to date. We therefore addressed whether the neurophysiological defects evidenced herein in mPFC networks of Dp71-null mice could be linked to high-order cognitive processing disabilities. We first showed that Dp71-null

mice have no deficit when tested for prepulse inhibition (PPI) of the acoustic startle reflex, a translational paradigm frequently used to detect deficits in gating sensorimotor inputs or early attentional control in rodent models of neuropsychiatric disorders (Kohl et al., 2013). We then investigated cognitive flexibility in a win-stay paradigm in a radial maze. While initial learning performance and reference memory errors were unaffected in Dp71-null mice in this task, their capacity to adapt exploration strategies during reversal learning was delayed compared to WT mice. No such deficits were detected in Dp427-deficient *mdx* mice using same methodology in a previous study (Chausseot et al., 2015), suggesting that impaired cognitive flexibility in spatial learning tasks is a specific feature associated with genetic loss of Dp71. The behavior of Dp71-null mice was also different from WT mice during reversal learning in a water-maze task, but initial learning and path efficiency were already altered before reversal, suggesting that hippocampal-dependent deficits were mainly influencing performance in this test (Daoud et al., 2009b). We then tested spatial working memory in win-shift paradigms in an automated radial maze with doors, in which newly acquired information needs to be updated on a moment-to-moment basis to guide adapted behavior. Mice of both genotypes were able to learn the rule and integrate cues and contingencies required for learning. In a first simple low-interference win-shift task, mice had to remember the spatial position of three visited arms in order to avoid errors during a subsequent choice trial. In this condition, mice of both genotypes displayed comparable performance and increasing the delay between the presentation and choice phases from 15 to 30 s did not significantly alter performance, suggesting comparable capacity to retain information in short-term memory storage to complete a directed task. In contrast, Dp71-null mice displayed a persistent performance deficit in a high-interference delayed non-matching to place paradigm. In this task, inter-trial delays were short (5s) but mice needed to maintain information in spite of competing demand and task-relevant proactive and retroactive interferences in a series of successive choice trials. Thus, Dp71-null mice display deficits in critical functions required to learn associations between temporally contingent stimuli and to better cope with changing environments. In both humans and rodents, general cognitive or intellectual abilities are strongly associated with the processing component of working memory, which requires resistance to interference and depends on prefrontal cortex, while the capacity for short-term maintenance of information is a poor predictor of cognitive level (Matzel and Kolata, 2010). The selective deficit shown by Dp71-null mice in the high-interference working memory task therefore constitutes a relevant phenotype analogous to the endophenotype thought to underlie individual differences in intellectual abilities in the human condition.

In conclusion, the Dp71-null mouse displays enhanced excitation and reduced synaptic plasticity in mPFC neuronal network associated with selective impairments in the processing component of spatial working memory and cognitive flexibility, suggesting that such defects in high-order cortical networks and executive functions underly intellectual disability in DMD patients lacking Dp71. Dp71 loss may likely alter E/I balance in other brain structures, as suggested for the hippocampus (Daoud et al., 2009b). Our current data show that elevated cellular excitation in hippocampo-prefrontal networks perturb learning and executive processes, which are viewed as

critical for intellectual functioning in humans. Although intellectual disability also arises with the loss of other brain dystrophins, particularly Dp140, it is noteworthy that a strong association was found between Dp71 loss and the deterioration of working memory in DMD patients with mutations downstream of exon 63 (Ricotti et al., 2016). As such mutations at the 3' end of the gene increase the risk for comorbid diagnosis of neuropsychiatric disorders, it will be important in future studies to determine whether Dp71 loss increases social behavior deficits and to compare with those reported in Dp427-deficient *mdx* mice (Miranda et al., 2015). There was no sign of epileptiform activity in neuronal networks of mice lacking either Dp427 or Dp71, though they display reduced inhibition or increased excitation, respectively. However, the cumulative loss of these two dystrophins might explain occurrence of epilepsy and more severe cognitive impairment in a subset of DMD patients (Hendriksen et al. 2015). A recent case study reporting a selective dysfunction of Dp71 associated with intellectual disability without myopathy (De Brouwer et al. 2014) further support the relevance of the Dp71-null mouse to unravel the mechanisms of intellectual disability in DMD.

References

- Abraham WC1, Huggett A. 1997. Induction and reversal of long-term potentiation by repeated high-frequency stimulation in rat hippocampal slices. *Hippocampus*. 7(2):137-45.
- Aleman V, Osorio B, Chavez O, Rendon A, Mornet D, et al. (2001) Subcellular localization of Dp71 dystrophin isoforms in cultured hippocampal neurons and forebrain astrocytes. *Histochem Cell Biol* 115: 243–254.
- Anderson JS, Carandini M, Ferster D (2000) Orientation tuning of input conductance, excitation, and inhibition in cat primary visual cortex. *J Neurophysiol* 84(2):909-26.
- Blake DJ, Hawkes R, Benson MA, Beesley PW (1999) Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia. *J Cell Biol* 147: 645–658.
- Borg-Graham LJ, Monier C, Frégnac Y (1998) Visual input evokes transient and strong shunting inhibition in visual cortical neurons. *Nature* 393:369-73.
- Borg-Graham LJ (2001) The computation of directional selectivity in the retina occurs presynaptic to the ganglion cell. *Nat Neurosci* 4(2):176-83.
- Chaussonot R, Edeline JM, Le Bec B, El Massioui N, Laroche S, Vaillend C. Cognitive dysfunction in the dystrophin-deficient mouse model of Duchenne muscular dystrophy: A reappraisal from sensory to executive processes. *Neurobiol Learn Mem*. 2015 Oct;124:111-22.
- Collingridge GL1, Peineau S, Howland JG, Wang YT 2010. Long-term depression in the CNS. *Nat Rev Neurosci*. Jul;11(7):459-73.
- Connors BW, Gutnick MJ. 1990. Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci*. Mar;13(3):99-104.
- Daoud F, Angeard N, Demerre B, Martie I, Benyaou R, Leturcq F, Cossée M, Deburgrave N, Saillour Y, Tuffery S, Urtizberea A, Toutain A, Echenne B, Frischman M, Mayer M, Desguerre I,

- Estournet B, Réveillère C, Penisson-Besnier, Cuisset JM, Kaplan JC, Héron D, Rivier F, Chelly J. Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression. *Hum Mol Genet.* 2009a Oct 15;18(20):3779-94.
- Daoud F, Candelario-Martínez A, Billard JM, Avital A, Khelfaoui M, Rozenvald Y, Guegan M, Mornet D, Jaillard D, Nudel U, Chelly J, Martínez-Rojas D, Laroche S, Yaffe D, Vaillend C. 2009b. Role of mental retardation-associated dystrophin-gene product Dp71 in excitatory synapse organization, synaptic plasticity and behavioral functions. *PLoS One.* Aug 10;4(8):e6574.
- De Brouwer AP, Nabuurs SB, Verhaart IE, Oudakker AR, Hordijk R, Yntema HG, Hordijk-Hos JM, Voeselek K, de Vries BB, van Essen T, Chen W, Hu H, Chelly J, den Dunnen JT, Kalscheuer VM, Aartsma-Rus AM, Hamel BC, van Bokhoven H, Kleefstra T. A 3-base pair deletion, c.9711_9713del, in DMD results in intellectual disability without muscular dystrophy. *Eur J Hum Genet.* 2014 Apr;22(4):480-5.
- Desguerre I, Christov C, Mayer M, Zeller R, Becane HM, Bastuji-Garin S, Leturcq F, Chiron C, Chelly J, Gherardi RK. Clinical heterogeneity of duchenne muscular dystrophy (DMD): definition of sub-phenotypes and predictive criteria by long-term follow-up. *PLoS One.* 2009;4(2):e4347.
- Fritschy JM. Epilepsy, E/I Balance and GABA(A) Receptor Plasticity. *Front Mol Neurosci.* 2008 Mar 28;1:5.
- Fujimoto T, Itoh K, Yaoi T, Fushiki S. Somatodendritic and excitatory postsynaptic distribution of neuron-type dystrophin isoform, Dp40, in hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Sep 12;452(1):79-84.
- Gatto CL, Broadie K. Genetic controls balancing excitatory and inhibitory synaptogenesis in neurodevelopmental disorder models. *Front Synaptic Neurosci.* 2010 Jun 7;2:4.
- Gorecki DC, Barnard EA (1995) Specific expression of G-dystrophin (Dp71) in the brain. *Neuroreport* 6: 893–896.
- Greger IH, Ziff EB, Penn AC. Molecular determinants of AMPA receptor subunit assembly. *Trends Neurosci.* 2007; 30(8):407-16.
- Haider B, Duque A, Hasenstaub AR, McCormick DA (2006) Neocortical network activity in vivo is generated through a dynamic balance of excitation and inhibition. *J Neurosci* 26(17):4535-45.
- Hendriksen RG, Hoogland G, Schipper S, Hendriksen JG, Vles JS, Aalbers MW. A possible role of dystrophin in neuronal excitability: a review of the current literature. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015 Apr;51:255-62.
- Higley MJ, Contreras D (2006) Balanced excitation and inhibition determine spike timing during frequency adaptation. *J Neurosci* 26(2):448-57.
- Howe JR. Modulation of non-NMDA receptor gating by auxiliary subunits. *J Physiol.* 2015; 593(1):61-72.

- Jones MW. A comparative review of rodent prefrontal cortex and working memory. *Curr Mol Med*. 2002 Nov;2(7):639-47.
- Katz B, Miledi R. 1968. The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol*. Mar;195(2):481-92.
- Kohl, S., Heekeren, K., Klosterkötter, J., & Kuhn, J. (2013). Prepulse inhibition in psychiatric disorders—apart from schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, 47, 445–452.
- Lederfein D, Levy Z, Augier N, Mornet D, Morris G, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U. A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jun15;89(12):5346-50.
- Lenk U, Hanke R, Thiele H, Speer A. Point mutations at the carboxy terminus of the human dystrophin gene: implications for an association with mental retardation in DMD patients. *Hum Mol Genet*. 1993 Nov;2(11):1877-81.
- Le Roux N, Amar M, Baux G, Fossier P (2006) Homeostatic control of the excitation-inhibition balance in cortical layer 5 pyramidal neurons. *Eur J Neurosci* 24(12):3507-18.
- Le Roux N, Amar M, Moreau A, Fossier P (2007) Involvement of NR2A- or NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors in the potentiation of cortical layer 5 pyramidal neurone inputs depends on the developmental stage. *Eur J Neurosci* 26(2):289-301.
- Le Roux N., Amar M., Moreaux A. and Fossier P. 2008. Impaired GABAergic transmission disrupts normal homeostatic plasticity in rat cortical networks. *European Journal of Neurosciences* 27(12); 3244-56.
- Losi G, Prybylowski K, Fu Z, Luo J, Wenthold RJ, Vicini S. 2003. PSD-95 regulates NMDA receptors in developing cerebellar granule neurons of the rat. *J Physiol*. Apr 1;548(Pt 1):21-9.
- Matzel LD, Kolata S. Selective attention, working memory, and animal intelligence. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010 Jan;34(1):23-30.
- McCormick DA, Connors BW, Lighthall JW, Prince DA. 1985. Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *J Neurophysiol*. Oct;54(4):782-806.
- Mento G, Tarantino V, Bisiacchi PS. The neuropsychological profile of infantile Duchenne muscular dystrophy. *Clin Neuropsychol*. 2011 Nov;25(8):1359-77.
- Meunier C., Amar M. and Fossier P. 2013. 5-HTA receptors direct the plasticity of layer 5 pyramidal neurons in the mouse prefrontal cortex. *Neuro Pharmacol*. 71:37-45.
- Meunier CN, Callebert J, Cancela JM, Fossier P. Effect of dopaminergic D1 receptors on plasticity is dependent of serotonergic 5-HT1A receptors in L5-pyramidal neurons of the prefrontal cortex. *PLoS One*. 2015 Mar16;10(3):e0120286.
- Milic Rasic V, Vojinovic D, Pesovic J, Mijalkovic G, Lukic V, Mladenovic J, Kosac A, Novakovic I, Maksimovic N, Romac S, Todorovic S, Savic Pavicevic D. Intellectual ability in the duchenne muscular dystrophy and dystrophin gene mutation location. *Balkan J Med Genet*. 2015 Apr 10;17(2):25-35.

- Miranda R, Nudel U, Laroche S, Vaillend C. 2011. Altered presynaptic ultrastructure in excitatory hippocampal synapses of mice lacking dystrophins Dp427 or Dp71. *Neurobiol Dis.* Jul;43(1):134-41.
- Miranda R, Nagapin F, Bozon B, Laroche S, Aubin T, Vaillend C. Altered social behavior and ultrasonic communication in the dystrophin-deficient mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Mol Autism.* 2015 Oct 29;6:60.
- Moizard MP, Toutain A, Fournier D, Berret F, Raynaud M, Billard C, Andres C, Moraine C. Severe cognitive impairment in DMD: obvious clinical indication for Dp71 isoform point mutation screening. *Eur J Hum Genet.* 2000 Jul;8(7):552-6.
- Monier C, Chavane F, Baudot P, Graham LJ, Frégnac Y (2003) Orientation and direction selectivity of synaptic inputs in visual cortical neurons: a diversity of combinations produces spike tuning. *Neuron* 37(4):663-80.
- Monier C, Fournier J, Frégnac Y. 2008. In vitro and in vivo measures of evoked excitatory and inhibitory conductance dynamics in sensory cortices. *J Neurosci Methods.* Apr 30; 169(2):323-65.
- Moreau AW, Amar M, Le Roux N, Morel N, Fossier P. 2010. Serotonergic fine-tuning of the excitation-inhibition balance in rat visual cortical networks. *Cereb Cortex.* 20(2):456-67.
- Moreau A.W., Amar M. and Fossier P. 2013. Serotonin affects the simultaneous long-term potentiation of excitation and inhibition in rat visual cortex. *Neurosci.* 238:148-158.
- Paxinos G, Franklin KBJ. 2001. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed.. San Diego (CA): Academic Press.
- Pozo K, Goda Y. Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity. *Neuron.* 2010 May 13;66(3):337-51.
- Ricotti V, Mandy WP, Scoto M, Pane M, Deconinck N, Messina S, Mercuri E, Skuse DH, Muntoni F. Neurodevelopmental, emotional, and behavioural problems in Duchenne muscular dystrophy in relation to underlying dystrophin gene mutations. *Dev Med Child Neurol.* 2016 Jan;58(1):77-84.
- Sarig R, Mezger-Lallemand V, Gitelman I, Davis C, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U. Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: differential activity of the Dp71 promoter during development. *Hum Mol Genet.* 1999 Jan;8(1):1-10.
- Shepherd JD1, Huganir RL. 2007. The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Annu Rev Cell Dev Biol.*;23:613-43.
- Shu Y, Hasenstaub A, McCormick DA (2003) Turning on and off recurrent balanced cortical activity. *Nature* 423(6937):288-93.
- Snow WM, Anderson JE, Jakobson LS. Neuropsychological and neurobehavioral functioning in Duchenne muscular dystrophy: a review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013 Jun;37(5):743-52.
- Tadayoni R, Rendon A, Soria-Jasso LE, Cisneros B. Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Mol Neurobiol.* 2012 Feb;45(1):43-60.

- Taylor PJ, Betts GA, Maroulis S, Gilissen C, Pedersen RL, Mowat DR, Johnston HM, Buckley MF. Dystrophin gene mutation location and the risk of cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One*. 2010 Jan 20;5(1):e8803.
- Thomson AM. Facilitation, augmentation and potentiation at central synapses. *Trends Neurosci*. 2000 Jul;23(7):305-12.
- Touzani K, Puthanveetil SV, Kandel ER. Consolidation of learning strategies during spatial working memory task requires protein synthesis in the prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 27;104(13):5632-7.
- Tozawa T, Itoh K, Yaoi T, Tando S, Umekage M, Dai H, Hosoi H, Fushiki S. The shortest isoform of dystrophin (Dp40) interacts with a group of presynaptic proteins to form a presumptive novel complex in the mouse brain. *Mol Neurobiol*. 2012 Apr;45(2):287-97.
- Turrigiano GG, Nelson SB. Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2004 Feb;5(2):97-107.
- Vaillend C, Perronnet C, Ros C, Gruszczynski C, Goyenvalle A, Laroche S, Danos O, Garcia L, Peltekian E. Rescue of a dystrophin-like protein by exon skipping in vivo restores GABAA-receptor clustering in the hippocampus of the mdx mouse. *Mol Ther*. 2010 Sep;18(9):1683-8.
- Vinkers CH, Mirza NR, Olivier B, Kahn RS. The inhibitory GABA system as a therapeutic target for cognitive symptoms in schizophrenia: investigational agents in the pipeline. *Expert Opin Investig Drugs*. 2010 Oct;19(10):1217-33.
- Waite A, Brown SC, Blake DJ. The dystrophin-glycoprotein complex in brain development and disease. *Trends Neurosci*. 2012 Aug;35(8):487-96.
- Wehr M, Zador AM (2003) Balanced inhibition underlies tuning and sharpens spike timing in auditory cortex. *Nature* 426(6965):442-6.
- Yizhar O, Fenno LE, Prigge M, Schneider F, Davidson TJ, O'Shea DJ, Sohal VS, Goshen I, Finkelstein J, Paz JT, Stehfest K, Fudim R, Ramakrishnan C, Huguenard JR, Hegemann P, Deisseroth K. Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature*. 2011 Jul 27;477(7363):171-8.
- Zucker RS, Regehr WG. 2002. Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol*;64:355-405.

II. Perception et mémoire émotionnelle : résultats complémentaires

1. Contexte de l'étude

La Dp71 est particulièrement exprimée à l'interface glio-vasculaire, mais elle est aussi détectée niveau post-synaptique dans les neurones. La Dp71 interagit avec des protéines transmembranaires telles que les dystroglycanes (Jung *et al.*, 1993), les canaux aqueux AQP4 et ioniques Kir4.1 dans les astrocytes (Amiry-Moghaddam *et al.*, 2004), et les récepteurs glutamatergiques NMDA et AMPA dans les synapses excitatrices (Daoud *et al.*, 2009). Dans le précédent article inclus dans cette thèse, nous avons montré que la perte de Dp71 chez la souris Dp71-null entraîne un déséquilibre de la balance excitation-inhibition neuronale et une altération de la plasticité synaptique dans l'hippocampe et dans les régions corticales préfrontales. Chez la souris Dp71-null, sélectivement déficiente en Dp71, on observe des dysfonctions exécutives caractérisées par des altérations de la flexibilité comportementale et de la mémoire de travail. Des déficits sensoriels légers sont également suspectés, notamment caractérisés au niveau de la rétine (Cia *et al.*, 2014). Bien que des troubles émotionnels aient été caractérisés chez les patients DMD (Ricotti *et al.*, 2016), le rôle pouvant être joué par la Dp71 dans ces fonctions est relativement peu documenté. Des perturbations émotionnelles ont été démontrées chez la souris *mdx* déficiente en Dp427 (voir II Emotions, fonctions motrices, Cognition et dysfonctions GABAergiques, page 83), mais une précédente étude chez la souris *mdx3cv* a aussi suggéré un rôle de la Dp71 dans ces fonctions (Vaillend et Ungerer, 1999). Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la mémoire émotionnelle, en utilisant différents protocoles de peur conditionnée, reposant sur l'amygdale et/ou l'hippocampe.

2. Méthodologie

a. Animaux

Les souris Dp71-null ont été générées par recombinaison homologe en remplaçant la majorité du premier exon et une petite partie du premier intron de la Dp71 par un gène codant pour la β -galactosidase. Ceci permet d'abolir la transcription des ARN_m de la Dp71 sans interférer avec l'expression des autres dystrophines (Sarig *et al.*, 1999). Les souris ont ensuite été croisées sur plus de dix générations de C57BL/6JRj (Janvier Labs, France) au CDTA (Orléans, France) et les reproducteurs nous ont été gracieusement offerts par le Dr. Alvaro Rendon (Institut de la Vision, Paris, France). La production et le maintien des colonies sont réalisés dans notre animalerie en croisant des femelles hétérozygotes avec des males C57BL/6JRj afin de générer des souris Dp71-null et leurs frères WT. Le génotype est déterminé par PCR ciblant le gène codant pour la β -galactosidase à partir d'ADN de la queue. Les animaux sont élevés sous un cycle jour-nuit de 12h (lumière de 7h à 19h) avec de la nourriture et de l'eau à volonté. Pour chaque expérience, nous avons

utilisé des groupes indépendants d'animaux naïfs, issus de la même portée, âgés de 10 à 16 semaines, isolés et manipulés quotidiennement cinq jours avant le début des expériences afin de réduire les réponses au stress en situation expérimentale. Les études sont réalisées en aveugle vis à vis du génotype, en suivant les directives européennes (2010/63/EU) et françaises (87/848). Notre animalerie est agréée sous le numéro #D91-471-104 et nos protocoles validés par le comité d'éthique #59.

b. Réponses auditives du tronc cérébral

i. Procédure

Les animaux ont été anesthésiés avec un mélange de kétamine (95mg/kg) et de xylazine (24mg/kg) en injection intrapéritonéale. Ceci a permis d'obtenir une anesthésie profonde sans mouvements musculaires susceptibles de parasiter nos enregistrements. L'animal a ensuite été placé sur une couverture chauffante pour éviter l'hypothermie induite par l'immobilité. Lors du placement des électrodes sous-cutanées, celle de référence est placée sur le vertex (à la surface du crâne), la masse est placée dans le muscle de la cuisse et l'électrode d'enregistrement à proximité de la bulla à l'arrière de l'oreille, le long de l'os du crâne (Willott, 2006). On place dans l'oreille droite de l'animal un haut parleur, en prenant soin de le diriger le long du conduit auditif et non en direction du lobe de l'oreille pour ne pas altérer le stimulus auditif. Chaque séance d'enregistrement dure au maximum une heure. Pour chaque souris, une série de stimuli auditifs sont présentés dans l'ordre suivant : un clic regroupant l'ensemble des fréquences (durée : 100 μ s), puis des sons purs de 8, 2, 16, 24, 4 et 32 kHz (durée : 10ms). Chaque stimulus est répété quinze fois par seconde, une fréquence suffisamment grande pour s'affranchir des réponses liées à l'activité cardiaque et respiratoire qui pourraient augmenter le bruit de fond et parasiter les enregistrements, jusqu'à obtenir 200 à 1000 réponses qui sont alors moyennées. Les stimuli sont diffusés à des intensités décroissantes, de 70 à 0 dB SPL, par pas de 10 dB SPL, afin de déterminer le seuil d'audition (Gourévitch *et al.*, 2009). Le dB SPL (Sound Pressure Level), est l'unité de mesure utilisée en acoustique, définie par le rapport de la puissance par unité de surface du son et une puissance par unité de surface de référence (20 μ Pa). Il permet de définir de façon absolue l'intensité du son contrairement au dB qui est une unité relative.

ii. Analyses

Tous les enregistrements sont effectués avec le logiciel Centor USB (DELTAMED). Le seuil d'audition est l'intensité qui précède celle à laquelle aucune onde auditive n'apparaît en réponse au stimulus, avec une précision de 10 dB SPL. L'amplitude de chaque onde biphasique correspond à la différence entre les pics positifs et négatifs (Par exemple entre I à I' pour l'onde I, Figure 13B, page 148). La latence au pic est définie à l'aide de marqueurs (I à IV, Figure 13B, page 148) placés au niveau pic positif de chaque onde (amplitude maximale), puis le logiciel calcule le temps séparant le moment auquel le stimulus auditif est présenté et le pic positif de l'onde. Les données sont présentées sous la forme d'une moyenne \pm SEM. Le seuil d'audition (dB SPL), la latence des pics composant l'onde

auditive (ms) et l'amplitude des ondes (μV) ont été analysés à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) avec un facteur indépendant (génotype) avec mesures répétées (fréquence en kHz, et intensité en dB SPL).

c. Apprentissage associatif et mémoire de peur

La capacité à associer un stimulus conditionné (SC) avec l'arrivée d'un choc électrique (stimulus inconditionné, SI) induisant une réponse de *freezing* a été évaluée dans deux paradigmes distincts, suivant un protocole de délai (où le SI survient immédiatement à la fin du SC) ou un protocole de trace (où le SI arrive après une période de latence de 30s, la « trace »). L'ajout d'une trace requiert le bon fonctionnement de l'hippocampe qui n'est pas requis en protocole de délai, reposant principalement sur l'amygdale.

i. Appareil

La chambre d'expérimentation carrée est composée de trois murs noirs, d'une porte frontale transparente (25cm de côté) et d'une grille au sol. Un nouveau contexte (murs blancs, sol blanc de texture différente) peut être mis en place (lors des séances de rétention) pour uniquement analyser les réponses de peur conditionnée indiquée au SC et non les réponses contextuelles (impliquant l'hippocampe). Les réponses de *freezing* de la souris sont détectées et transduites par un accéléromètre piézoélectrique en contact avec la grille. Un haut-parleur monté 25cm au dessus du sol permet d'émettre un bruit blanc (60dB) pendant l'expérience (bruit de fond) et d'émettre à volonté des stimuli acoustiques de fréquence pure. L'appareil est confiné dans une enceinte obscure, ventilée et insonorisée (67x53x55cm), sur une table anti-vibration. La présentation des stimuli est contrôlée par le logiciel Freezing (PanLab, Espagne) tandis qu'une interface digitalise, rectifie, et enregistre les réponses de l'accéléromètre. La calibration du haut parleur est réalisée à 10kHz à l'aide d'un sonomètre. Les sons générés sont des signaux sinusoïdaux sur lesquels sont appliqués une montée et une descente progressive de l'amplitude (montée : 5ms ; descente : 5ms), afin de reproduire les sons de manière fiable et sans artefacts. L'appareil est nettoyé avec de l'éthanol absolu entre chaque animal.

ii. Peur conditionnée en protocole de délai

L'animal est soumis à une séance d'acquisition constituée d'une période d'acclimatation de 2min suivie de 5 essais séparés pseudo-aléatoirement par un intervalle de 60-180s (acquisition). La séance se termine 3min après le dernier choc. Dans une expérience distincte, le nombre d'essais est diminué à 3 afin de fragiliser le conditionnement. Lors de chaque essai, le SC (son de 80dB, 10kHz, 30s) précède immédiatement l'arrivée du SI (choc électrique de 0.4mA, 2s) délivré au niveau de la grille. Durant les deux jours suivants (rétention 1 et 2), les souris sont placées dans le nouveau contexte (murs blancs, sol blanc de texture différente) et 16 SC seuls (sans SI) sont présentés à des intervalles (ITI) de 60-150s en ordre pseudo-aléatoire.

iii. *Peur conditionnée en protocole de trace*

Le premier jour, l'animal est familiarisé 5min à l'appareil (habituation). Le lendemain, il est soumis à une séance d'acquisition constituée d'une période d'acclimatation de 3min suivie de 6 essais séparés aléatoirement par 120, 180 ou 240s. Lors de chaque essai le SC (son de 80dB, 10kHz, 15s) précède l'arrivée du SI (choc électrique de 0.4mA, 2s), qui est délivré au niveau de la grille au sol après un intervalle de 30s (trace). La séance se termine 3min après le dernier choc.

Après un délai de 24h, la souris est placée dans un nouveau contexte et après une période d'acclimatation de 3 min, elle est soumise à une séance de rétention au cours de laquelle on lui présente trois fois le SC (3 fois 30s) avec un ITI de 1min (rétention indiquée par le stimulus auditif). La séance se termine 1min après la dernière présentation.

Une seconde séance de rétention, visant à mesurer la peur conditionnée au contexte, est effectuée au minimum 3h plus tard. L'animal est alors replacé dans le contexte initial et le temps d'immobilité est mesuré durant 5min, sans qu'aucun son ou choc ne soit délivré.

iv. *Analyse*

Au cours de toutes ces phases expérimentales, les périodes d'immobilité des souris sont détectées par l'accéléromètre en continu et sont interprétées comme des réponses de peur (« *freezing* »). Le critère est une activité inférieure à un seuil arbitrairement fixé à 10 pendant plus d'une seconde (défini par comparaison avec des mesures manuelles en video-tracking). Ces périodes sont normalisées à la durée de la période d'enregistrement (pourcentage de *freezing*). Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM et sont comparées par des analyses de variance (ANOVA) avec un facteur indépendant (génotype) et un facteur dépendant (paramètre mesuré) pouvant le cas échéant faire l'objet d'analyses en mesures répétées (jours d'apprentissage, blocs d'essais). Le seuil de significativité est fixé à $p=0.05$.

3. Résultats

a. Réponses auditives du tronc cérébral

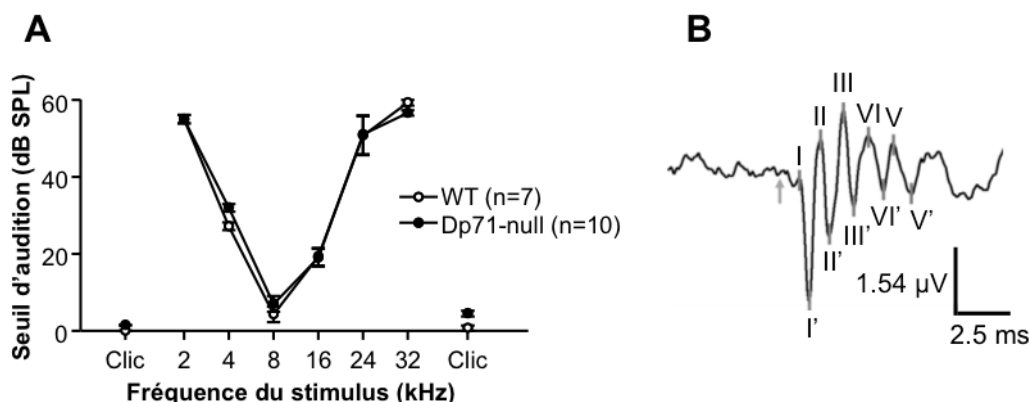


Figure 13 - Réponses auditives du tronc cérébral (auditory brainstem responses, ABR) enregistrées chez les souris WT et Dp71-null.

(A) Seuil d'audition pour les clics en début et en fin de séance et les sons en fréquences pures démontrent une audition normale chez les souris Dp71-null. (B) Exemple d'une réponse ABR à un clic à 70 dB, montrant les différentes ondes auditives évoquées étiquetées de I à V (pics positifs) et I' à V' (pics négatifs). Flèche grise : présentation du clic.

Les apprentissages associatifs de peur conditionnée que nous avons effectués reposant sur des stimuli conditionnés sonores, vérifier l'intégrité de la perception auditive de la souris Dp71-null était requise. En collaboration avec l'équipe de J.-M. Edeline (Orsay, France) spécialisée dans l'étude de l'audition, nous avons pu réaliser des mesures précises (Figure 13).

Les seuils d'audition (exprimés en dB SPL) sont comparables entre les génotypes en réponse aux clics au début de séance ($p > 0.2$) et en fin de séance ($p > 0.1$). De plus, le seuil mesuré en début de séance est identique à celui de fin ($p > 0.6$) indiquant que notre protocole n'induit pas de trauma auditif chez les animaux. La courbe des seuils d'audition en réponse à des fréquences pures présentent une forme typique en V (effet de la fréquence : $p < 0.0001$) avec un seuil optimal à 8 kHz, en accord avec la littérature (Willott, 2006 ; Chabout *et al.*, 2013) et aucune différence n'est observée entre les génotypes (effet génotype : $p > 0.7$, interaction génotype \times fréquence : $p > 0.8$).

Nous avons ensuite analysé les paramètres électrophysiologiques (amplitude, latence) des ondes I et III évoquées pour le clic à toutes les intensités (non montré). L'onde I traduit la volée afférente du nerf auditif, tandis que l'onde III correspond à l'intégration centrale du signal au niveau du complexe olivaire supérieure. Ce sont donc deux ondes très importantes dans l'intégration du stimulus au niveau sensoriel (cochlée) et central (noyau cochléaire). Il n'y a aucune différence d'amplitude ni de latence des ondes entre les souris WT et Dp71-null quelque soit l'intensité considérée. On observe que plus l'intensité considérée est forte, plus la latence diminue (effet intensité : $p < 0.0001$) et plus l'amplitude

augmente (effet intensité : $p < 0.0001$) traduisant l'augmentation du nombre de fibres activées dans le nerf auditif.

b. Apprentissage associatif et mémoire de peur

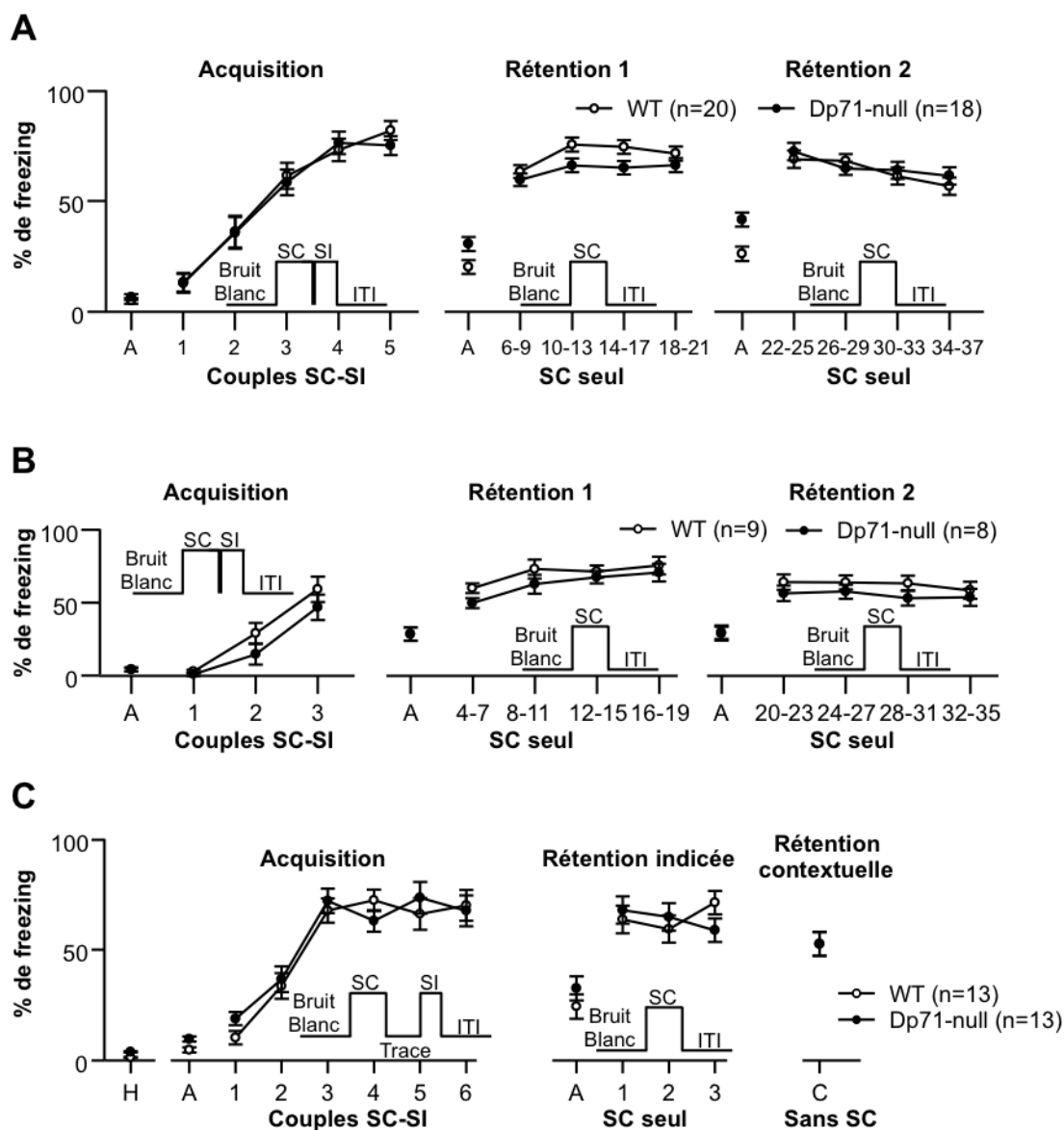


Figure 14 - Apprentissage associatif et mémoire de peur chez les souris WT et Dp71-null.

(A-B) Peur conditionnée indiquée en protocole de délai. Les performances sont exprimées en pourcentage du temps passé en *freezing* en réponse au SC durant la séance d'acquisition, constituée de la présentation de 5 couples SC-SI (A) ou seulement 3 couples SC-SI (B), et au cours des deux séances de rétention (bloc de 4 SC) réalisées à 24h puis 48h après l'acquisition. A: acclimatation avant la séance. (C) Peur conditionnée indiquée en protocole de trace. Les performances sont exprimées en pourcentage du temps passé en *freezing* en réponse au SC durant la session d'acquisition (6 associations SC-SI) et les séances de rétention réalisées à 24h. H: Habituation à l'appareil la veille de l'acquisition. A: acclimatation avant la séance. C : rétention dans le contexte d'acquisition sans SC, 3h minimum après la rétention indiquée.

Nous avons commencé par présenter 5 couples SC-SI (Figure 14A) en protocole de délai aux souris. Les souris Dp71-null et WT présentent des périodes d'immobilité très courtes et comparables lors de l'acclimatation ($p > 0.4$), puis le conditionnement se met en place progressivement et est reflété par une augmentation du *freezing* ($p < 0.001$) durant la

présentation des 5 SC (effet génotype : $p > 0.8$; interaction génotype \times SC : $p > 0.8$). Durant les deux jours suivants (rétention 1 à 24h et rétention 2 à 48h), 16 SC (sons) ont été présentés sans SI. Les souris Dp71-null présentent une réponse de *freezing* similaire aux souris WT lors de chaque séance (rétention 1 : effet génotype : $p > 0.1$, effet génotype \times SC : $p > 0.4$; rétention 2 : effet génotype : $p > 0.6$, effet génotype \times SC : $p > 0.2$). Lors de la phase d'acclimatation (Figure 14A) de la rétention 1, les souris Dp71-null présentent des réponses de *freezing* légèrement plus longues que les WT mais cette différence n'est pas significative ($p > 0.05$). Par contre cette augmentation du *freezing* est significativement plus forte chez les Dp71-null lors de l'acclimatation de la rétention 2 ($p < 0.01$).

Nous avons ensuite tenté, dans un autre groupe de souris, de fragiliser l'apprentissage en réduisant le nombre de couples SC-SI lors de l'acquisition (Figure 14B). Cependant, nous observons toujours des performances similaires entre les génotypes pendant l'acquisition (acclimatation : $p > 0.9$, SC 1-3 : effet génotype : $p > 0.1$, évolution de la performance : $p < 0.0001$, interaction génotype \times SC : $p > 0.3$), ainsi que pendant la rétention 1 (acclimatation : $p > 0.9$, SC 4-19 : effet génotype : $p > 0.2$, interaction génotype \times SC : $p > 0.5$) et la rétention 2 (acclimatation : $p > 0.8$, SC 4-19 : effet génotype : $p > 0.3$, interaction génotype \times SC : $p > 0.8$).

Dans un conditionnement dit « de trace » (Figure 14C), les souris Dp71-null effectuent un peu plus de *freezing* lors de la phase d'habituation (Dp71-null : 3.9%, WT: 1.4%, $p = 0.02$) et au cours de la période d'acclimatation lors de l'acquisition (Dp71-null : 9.7%, WT: 4.7%, $p = 0.03$). Cependant les réponses de peur sont comparables au cours du conditionnement en réponse aux 6 SC-SI (effet génotype : $p > 0.2$, évolution de la performance : $p < 0.0001$, interaction génotype \times SC : $p > 0.1$). Lors du rappel indicé et du rappel dans le contexte initial, le lendemain, aucune différence n'est observée entre les génotypes (rappel indicé : acclimatation : $p > 0.2$, SC 1-3 : effet génotype : $p > 0.8$, interaction génotype \times SC : $p > 0.05$; rappel du context : $p > 0.9$).

4. Discussion

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle de la Dp71 dans la rétine chez la souris Dp71-null (Sene *et al.*, 2009 ; Dalloz *et al.*, 2003 ; Cia *et al.*, 2014 ; El Mathari *et al.*, 2015), et ont suggéré un rôle possible dans les fonctions sensorielles. C'est pourquoi il était important de vérifier son implication dans l'audition, d'autant que nous avons utilisé des stimuli auditifs dans nos tâches d'apprentissage au cours de cette étude. La mesure de l'ABR permet d'étudier à la fois l'intégration des stimuli auditifs au niveau sensoriel (cochlée) et au niveau central (noyau cochléaire). Nous n'avons trouvé aucune altération auditive chez la souris Dp71, malgré une analyse poussée de l'amplitude et de la latence des ondes auditives. Nous avons également mis en évidence dans l'une de nos publications (voir Filtrage sensoriel et fonctions exécutives, page 107) que la souris Dp71-null ne présente aucun déficit dans le filtrage des stimuli sensoriels auditifs.

La Dp71 est la dystrophine majoritaire au niveau central, et nous avons montré son implication dans des tâches d'apprentissage et de mémoire impliquant la boucle

hippocampo-corticale (voir I Filtrage sensoriel et fonctions exécutives, page 107). De plus, la Dp71 est impliquée dans la neurotransmission glutamatergique, son absence entraînant une augmentation de la plasticité synaptique dans l'hippocampe (Daoud *et al.*, 2009), mais également une altération de la balance excitation-inhibition corticale. Des études suggèrent aussi un rôle très important du glutamate dans les réponses de peur conditionnée et l'anxiété (voir Riaza Bermudo-Soriano *et al.*, 2012 pour une revue). En effet, l'injection d'un antagoniste des récepteurs au NMDA dans les noyaux amygdaliens (latéral et basal) dégrade l'acquisition de la peur conditionnée à un son (Lee & Kim, 1998) et au contexte (Fanselow *et al.*, 1994 ; Maren, 1996). Ici nous avons testé l'hypothèse d'altérations de la mémoire émotionnelle, qui peut impliquer un circuit de structures cérébrales incluant les noyaux amygdaliens, le thalamus et le cortex auditif (Herry & Johansen, 2014). En protocole de trace, le cortex entorhinal et perirhinal, l'hippocampe et le cortex préfrontal viennent s'ajouter au circuit (LeDoux 2000 ; Esclassan *et al.*, 2009 ; Esclassan *et al.*, 2009).

Malgré toutes les pistes suggérant que les processus impliqués dans la peur conditionnée pourraient être altérés chez la souris Dp71-null, nous ne trouvons aucune différence de comportement entre les souris WT et Dp71-null dans nos protocoles. De même, les tâches comportementales mettant en jeu le cervelet (coordination motrice, mémoire procédurale mise en jeu dans une stratégie de navigation en piscine) semblent peu affectées chez la souris Dp71-null (C. Vaillend, données non publiées). Ceci suggère que l'hyperexcitabilité neuronale induite par la perte de Dp71 affecte majoritairement les tâches impliquant la boucle hippocampo-corticale.

Ces expériences feront l'objet d'une publication, en étant complétées par des résultats mettant en évidence une augmentation de l'anxiété (Master II de Delphine Le Verger) et et des altérations du comportement social et des vocalisations (collaboration avec R. Miranda, Université de Madrid, Espagne) chez la souris Dp71-null.

Chapitre III

Restauration de la Dp427 par thérapie génique

I. Contexte de l'étude

Des mutations dans le gène *dmd* entraînant la perte d'expression de la dystrophine sont responsables de la myopathie de Duchenne. Ce gène est remarquable, principalement du fait de sa taille : c'est le plus grand gène du chromosome X et l'un des plus grands du génome humain. Cette taille le rend susceptible à de nombreuses mutations : dans 66% des cas, on observe de larges délétions touchant un ou plusieurs exons, dans 10 à 15% des cas, il s'agit de duplications et dans le reste des cas (~20%) de mutations ponctuelles non sens ou de petites délétions/insertions. En général, ces mutations vont provoquer une perte ou un décalage du cadre de lecture résultant dans la non-expression de la protéine.

Une approche de remplacement de gène apporté par un virus, n'est pas possible pour la forme complète de la dystrophine (Dp427) du fait de sa taille, bien qu'il ait été tenté d'exprimer une mini-dystrophine comportant les domaines indispensables de la protéine tout en conservant sa fonction. D'autres approches ont donc été tentées, visant les patients présentant des mutations ponctuelles, ou des mutations ne touchant qu'un seul exon. L'idée étant non plus de remplacer toute la protéine *-par un apport exogène d'une version tronquée mais fonctionnelle-* mais d'utiliser de petites séquences antisens qui vont cibler spécifiquement l'exon contenant la mutation, au niveau du pré-ARN_m, et vont forcer son épissage (saut d'exon, *exon skipping*), de façon à restaurer un cadre de lecture et à permettre ainsi la réexpression d'une dystrophine presque complète.

Actuellement, les thérapies à base d'oligonucléotides antisens sont prometteuses dans les essais cliniques basés sur le saut d'exon, mais leur faible absorption par les tissus cardiaques et cérébraux ne permet pas encore d'observer des effets suffisants pour améliorer considérablement la condition des patients.

Dans cette étude collaborative (A. Goyenvallée et L. Garcia, Laboratoire END-ICAP, Université Versailles Saint-Quentin en Yvelines), nous avons testé une nouvelle génération d'oligonucléotide antisens formé d'ADN tri-cyclique (tcDNA), qui présente des propriétés pharmacologiques nouvelles offrant une absorption beaucoup plus forte par les tissus lors d'administration systémique chez deux souris modèles de la myopathie de Duchenne.

II. Méthodologie

Nous avons comparé le TcDNA à deux autres oligonucléotides déjà utilisés dans des études cliniques (2'OMe et PMO). Différentes concentrations ont été utilisées afin de définir la dose minimale effective pour chacune des trois molécules en utilisant deux souris modèles de la *dmd* : la souris *mdx* et la souris double knock-out dystrophine/utrophine (*dKO*).

Des techniques d'études des propriétés physiques (analyse du suivi individuel des particules (*nanoparticle tracking analysis*, *NTA*), microscopie électronique à transmission (*transmission electron microscopy*, *TEM*) et chromatographie d'exclusion couplée en ligne avec la mesure de la diffusion de la lumière multi-angle (*size-exclusion chromatography with multi-angle static light scattering*, *SEC-MALS*) ont été utilisées pour analyser le comportement des molécules en milieu aqueux. Puis, des études pharmacocinétiques (chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse) ont été utilisées

pour quantifier la stabilité des molécules dans les tissus. L'efficacité du saut d'exon a ensuite été vérifiée en quantifiant le niveau d'expression de l'ARN par RT-PCR, puis de la protéine par western blot.

Nos collaborateurs se sont intéressés aux impacts physiologiques du traitement, en étudiant la fonction motrice (réponse du muscle tibial antérieur suite à la stimulation du nerf sciatique), la fonction respiratoire (pléthysmographie) et la fonction cardiaque (échocardiographie). Notre participation a été d'analyser la réexpression de la dystrophine dans le cerveau par immunofluorescence puis d'évaluer les effets compensateurs des traitements sur la réponse de peur inconditionnée de la souris *mdx*. Nous avons comparés les souris WT, *mdx* et *mdx* traitées avec le 2'OMe, PMO et tcDNA.

III. Résultats

L'analyse du suivi individuel des particules (NTA) prouve que le tcDNA forme spontanément des particules de 40 à 100 nm contrairement aux 2'OMe et PMO, ce qui a été confirmé par microscopie électronique et SEC-MALS. Ceci imite les propriétés de certains agents de transfection et peut éventuellement expliquer l'amélioration de l'assimilation par les cellules du tcDNA par rapport aux 2'OMe et PMO. Les études de pharmacocinétique montrent que la demi-vie du tcDNA dans l'organisme est approximativement de 45 jours, sa présence étant toujours significative trois mois après la fin du traitement dans des tissus tels que le muscle et le cerveau (~20% de la dose initiale). De plus, le tcDNA engendre trois à quatre fois plus de saut d'exon que le 2'OMe et le PMO, à des doses équimolaires, dans des tissus tels que le diaphragme et le cœur, habituellement difficiles d'accès pour les thérapies. Les études sanguines montrent une baisse de la créatine kinase (marqueur de la fragilité des membranes des fibres musculaires dans la DMD) plus marquée chez les animaux traités au tcDNA et dépendante de la dose injectée.

Au niveau phénotypique, la force musculaire est normalisée par le tcDNA (de façon dose-dépendante) au contraire du 2'OMe et du PMO qui ne font que l'améliorer sans égaler le niveau des souris WT. La fonction respiratoire s'améliore en fonction du niveau de réexpression de dystrophine dans le diaphragme, celui-ci étant plus élevé chez les souris traitées au tcDNA (~50%) que chez les souris traitées au 2'OMe (20%) et au PMO (28%). Nous observons également une amélioration des constantes cardiaques chez les animaux traités au tcDNA à la plus forte dose, associée à une réexpression de dystrophine plus importante dans le cœur par rapport aux animaux traités avec le 2'OMe ou le PMO. Enfin, nous montrons également des bénéfices importants chez la souris *dKO* dystrophine/utrophine, dont le phénotype moteur est encore plus sévère que celui de la souris *mdx*.

Au niveau cérébral, seul le tcDNA induit un saut de l'exon 23 et une réexpression de dystrophine chez la souris *mdx*, certes à des niveaux assez faibles (~2% dans l'hippocampe et le cortex, ~6% pour le cervelet), mais cela prouve que cette molécule est capable de franchir la barrière hémato-encéphalique, contrairement aux autres formes d'oligonucléotides. De plus, notre analyse immunohistochimique a mis en évidence la

présence d'un marquage ponctiforme de dystrophine dans l'hippocampe des souris traitées au tcDNA, signe d'une réexpression synaptique partielle de dystrophine.

Enfin, nous montrons que le traitement au tcDNA normalise les réponses d'immobilité tonique (*freezing*) suite à une contention chez la souris *mdx*, phénotype comportemental le plus robuste chez cette souris, qui a été associé à une altération de l'amygdale, structure cérébrale impliquée dans l'émotivité, la réponse comportementale au stress et la mémoire émotionnelle (voir II Emotions, fonctions motrices, Cognition et dysfonctions GABAergiques, page 83). Au contraire, le 2'OMe et le PMO n'ont aucun effet améliorateur sur le comportement des souris *mdx*, en accord avec leur incapacité à franchir la barrière hémato-encéphalique dans ces conditions (saut d'exon indétectable dans le cerveau des souris *mdx* traitées avec ces molécules).

IV. Conclusion

Les mécanismes responsables de l'amélioration de l'efficacité du tcDNA par rapport à d'autres molécules comme le 2'OMe ou le PMO sont encore mal compris. Une hypothèse expliquant ce phénomène peut être sa capacité à s'assembler spontanément en nanoparticules, ce qui pourrait favoriser son transport sanguin puis sa capacité à franchir la barrière endothéliale. Sa forte hydrophobicité et sa résistance aux RNAses joue sans doute aussi un rôle dans ces propriétés exceptionnelles du tcDNA.

Nous montrons que son mode d'action est dose-dépendant, offrant à sa plus forte dose une meilleure efficacité que le 2'OMe et le PMO et conduisant à une amélioration phénotypique, aux niveaux musculaire, respiratoire et cardiaque. Mais au-delà de ces aspects physiologiques périphériques, le tcDNA s'est également montré efficace pour abolir le phénotype comportemental le plus robuste de la souris *mdx*, sa réponse de peur exacerbée suite à un stress léger. La présence de réexpression de dystrophine dans le cerveau suite au traitement par le tcDNA est un résultat majeur, les oligonucléotides antisens étant généralement incapables de franchir la barrière hémato-encéphalique.

Ces résultats encourageants ne doivent pas faire oublier le point crucial des thérapies géniques : leur capacité à être tolérée par l'organisme. Nous n'avons observé aucun signe de toxicité évident au cours de nos expérimentations, mais rien ne permet d'exclure une différence de tolérance chez l'humain. Des études toxicologiques sont en cours dans le laboratoire de nos collaborateurs.

La capacité du tcDNA à restaurer la dystrophine dans tous les tissus affectés (incluant le muscle squelettique, le cœur et le système nerveux central), après des injections systémiques chroniques, ainsi que son impact au niveau respiratoire, cardiaque et comportemental, fait de cette molécule un candidat attractif pour traiter simultanément l'ensemble des phénotypes qui caractérisent le syndrome de DMD, mais également pour d'autres pathologies génétiques pouvant être traitées par saut d'exon.

Article n°4

**Functional correction in
mouse models of muscular
dystrophy using exon-
skipping tricyclo-DNA
oligomers**

Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers

Aurélie Goyenvalle¹, Graziella Griffith¹, Arran Babbs², Samir El Andaloussi^{3,4}, Kariem Ezzat⁴, Aurélie Avril¹, Branislav Dugovic⁵, Rémi Chaussonot^{6,7}, Arnaud Ferry⁸, Thomas Voit⁸, Helge Amthor¹, Claudia Bühr⁹, Stefan Schürch⁹, Matthew J A Wood⁴, Kay E Davies², Cyrille Vaillend^{6,7}, Christian Leumann⁹ & Luis Garcia¹

Antisense oligonucleotides (AONs) hold promise for therapeutic correction of many genetic diseases via exon skipping, and the first AON-based drugs have entered clinical trials for neuromuscular disorders^{1,2}. However, despite advances in AON chemistry and design, systemic use of AONs is limited because of poor tissue uptake, and recent clinical reports confirm that sufficient therapeutic efficacy has not yet been achieved. Here we present a new class of AONs made of tricyclo-DNA (tcDNA), which displays unique pharmacological properties and unprecedented uptake by many tissues after systemic administration. We demonstrate these properties in two mouse models of Duchenne muscular dystrophy (DMD), a neurogenetic disease typically caused by frame-shifting deletions or nonsense mutations in the gene encoding dystrophin^{3,4} and characterized by progressive muscle weakness, cardiomyopathy, respiratory failure⁵ and neurocognitive impairment⁶. Although current naked AONs do not enter the heart or cross the blood-brain barrier to any substantial extent, we show that systemic delivery of tcDNA-AONs promotes a high degree of rescue of dystrophin expression in skeletal muscles, the heart and, to a lesser extent, the brain. Our results demonstrate for the first time a physiological improvement of cardio-respiratory functions and a correction of behavioral features in DMD model mice. This makes tcDNA-AON chemistry particularly attractive as a potential future therapy for patients with DMD and other neuromuscular disorders or with other diseases that are eligible for exon-skipping approaches requiring whole-body treatment.

Exon skipping using AONs to restore an open reading frame, thereby establishing expression of a truncated but functional dystrophin, is currently one of the most attractive approaches for the treatment of DMD. Early human clinical trials testing either 2'-O-methyl-modified oligoribonucleotides with a uniform phosphorothioate backbone (2'OMe) or phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMO), both

targeting the *DMD* exon 51, reported encouraging results^{1,2,7}, but recent studies have failed to show marked clinical benefit, probably as a result of insufficient rescue of dystrophin expression⁸. Moreover, it is known from preclinical studies in mice that these two chemistries are not effective for treating cardiac and central nervous system (CNS) defects, which represent a key challenge for success in many multisystemic disorders⁹.

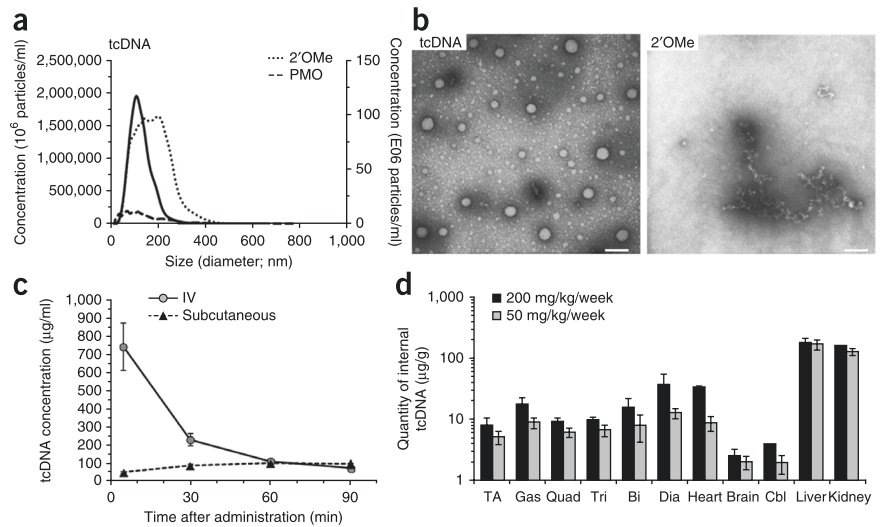
Our goal here was to investigate the potential of tcDNA, a new DNA analog, to restore dystrophin expression to levels necessary for a life-changing therapy for patients with DMD. This type of DNA is a conformationally constrained oligonucleotide analog^{10,11} that deviates from natural DNA by the presence of three additional carbon atoms between C5' and C3' (Supplementary Fig. 1). These chemical modifications result in increased RNA affinity by 2–4 °C per modification, increased hydrophobicity, increased nuclease resistance for both phosphate and thiophosphate internucleotide linkages, and an inability to elicit RNase H activity¹². Furthermore, fully modified as well as gapmer tcDNA-AONs in the length range of 11–20 nucleotides have been shown to produce potent antisense effects^{12–14}. Naked tcDNA is readily soluble in aqueous solutions; however, nanoparticle tracking analysis (NTA) revealed that, in contrast to the corresponding 2'OMe and PMO oligomers, tcDNA spontaneously formed defined nanoparticles ranging from 40 to 100 nm (Fig. 1a), as confirmed by transmission electron microscopy (TEM; Fig. 1b) and size-exclusion chromatography with multi-angle static light scattering (SEC-MALS) (Supplementary Fig. 2). This self-association imitates features of transfection reagents and nanoparticle delivery systems¹⁵ and hence could potentially improve cellular uptake compared to 2'OMe and PMO oligomers.

Pharmacokinetic studies were performed in *Dmd*^{mdx} mice (hereafter referred to as *mdx* mice), which carry a nonsense mutation in exon 23 of the *Dmd* gene¹⁶, upon systemic delivery of 200 mg/kg doses of a tcDNA-AON that targets *Dmd* exon 23. We collected blood samples at different time points after injection and assessed tcDNA-AON levels by HPLC-MS/MS analysis (Fig. 1c). Serum levels of tcDNA-AON

¹Université de Versailles St-Quentin, INSERM U1179, LIA BAHN CSM, Montigny-le-Bretonneux, France. ²MRC Functional Genomics Unit, University of Oxford, Oxford, UK. ³Department of Laboratory Medicine, Karolinska Institutet, Huddinge, Sweden. ⁴Department of Physiology, Anatomy and Genetics, University of Oxford, Oxford, UK. ⁵SYNTHENA AG, Bern, Switzerland. ⁶Université Paris-Sud, Centre de Neurosciences Paris-Sud, UMR8195, Orsay, France. ⁷CNRS, Orsay, France. ⁸Institut de Myologie, Université Pierre et Marie Curie, INSERM U974, CNRS FRE 3217, Paris, France. ⁹Department of Chemistry and Biochemistry, University of Bern, Bern, Switzerland. Correspondence should be sent to L.G. (luis.garcia@uvsq.fr) or C.L. (christian.leumann@pcb.unibe.ch).

Received 20 May 2014; accepted 30 October 2014; published online 2 February 2015; doi:10.1038/nm.3765

Figure 1 Properties and biodistribution of tcDNA-AON. (a) NTA analysis of spontaneous nanoparticle formation of tcDNA, 2'OMe, or PMO (200 μ M in PBS). Results are representative from at least three independent experiments. (b) Negatively stained TEM pictures of particle patterns formed by tcDNA and 2'OMe oligonucleotide chemistries at 370 μ M. Scale bars, 100 nm. (c) Pharmacokinetics of tcDNA-AON after IV or subcutaneous injection of a single dose of 200 mg/kg of tcDNA, analyzed by HPLC-MS/MS. (d) Levels of tcDNA in the tibialis anterior (TA), gastrocnemius (Gas), quadriceps femoris (Quad), triceps brachialis (Tri), biceps brachialis (Bi), diaphragm (Dia), heart, brain, cerebellum (Cbl), liver and kidney, following a 12-week treatment at 200 or 50 mg/kg/week. $n = 4$ per group; error bars are \pm sem; error bar for Cbl (black bar) ± 0.02 .



decayed rapidly, within 1 h, although detectable amounts were still present at 90 min with no evidence of degradation products. This result demonstrates the absolute stability of tcDNA oligomers in tissues. To study biodistribution, we treated animals for 12 weeks with 50 or 200 mg/kg/week of tcDNA-AONs and analyzed their abundance 2 weeks after the final injection. We were able to detect tcDNA-AONs in all tested skeletal muscles as well as in heart and brain (Fig. 1d). Predictably, compound uptake in tissues was dose dependent, peaking in liver and kidneys. The clearance of tcDNA-AONs was faster in liver and kidneys than in other tissues. Notably, marked levels of the compounds were still present in tissues of interest, such as muscles and the brain (>20% of initial load), 12 weeks after the end of the treatment (Supplementary Fig. 3a), suggesting a tcDNA-AON tissue half-life of approximately 45 d (Supplementary Fig. 3b).

To compare effectiveness of tcDNA to 2'OMe and PMO, we used three overlapping AONs targeting the 5' donor splice site of *Dmd* intron 23, based on previously optimized sequences^{17–19}. In the mouse exon 23, numbered in reference to the donor splice site (M23D): tcDNA (+2 to –13 nt); 2'OMe (+2 to –18 nt); and PMO (+7 to –18 nt) (Supplementary Table 1). We tested these three AONs at different dosages up to 200 mg/kg in adult *mdx* mice through weekly intravenous (IV) injections for 12 weeks. Taking into account the differences in molecular mass between the three types of AONs, we also administered an equimolar dosage (15 μ mol/kg/week) corresponding to 80, 100 and 125 mg/kg/week for tcDNA, 2'OMe and PMO, respectively. Consistent with the pharmacokinetic analysis reported above, the presence of tcDNA-M23D was associated with the occurrence of dystrophin transcripts lacking exon 23 in all muscle samples, as shown by RT-PCR. In addition, qPCR revealed consistently higher exon skipping levels for tcDNA than for 2'OMe and PMO AONs (Fig. 2a,b). On average, tcDNA treatment induced 5–6-fold higher levels of skipping than 2'OMe and PMO at the higher dosing regimen and 3–4-fold higher levels at the equimolar dosing regimen. Production of dystrophin protein was confirmed by western blot analysis (Fig. 2c,d). We also found that tcDNA promoted, in a dose-dependent manner, significantly higher levels of dystrophin than 2'OMe and PMO, particularly in diaphragm and heart, where levels reached 50% and 40%, respectively, compared to wild-type (WT) mice. Notably, both exon 23 skipping and dystrophin protein were seen in the CNS of animals exclusively following treatment with tcDNA, although levels were much lower than in skeletal muscles

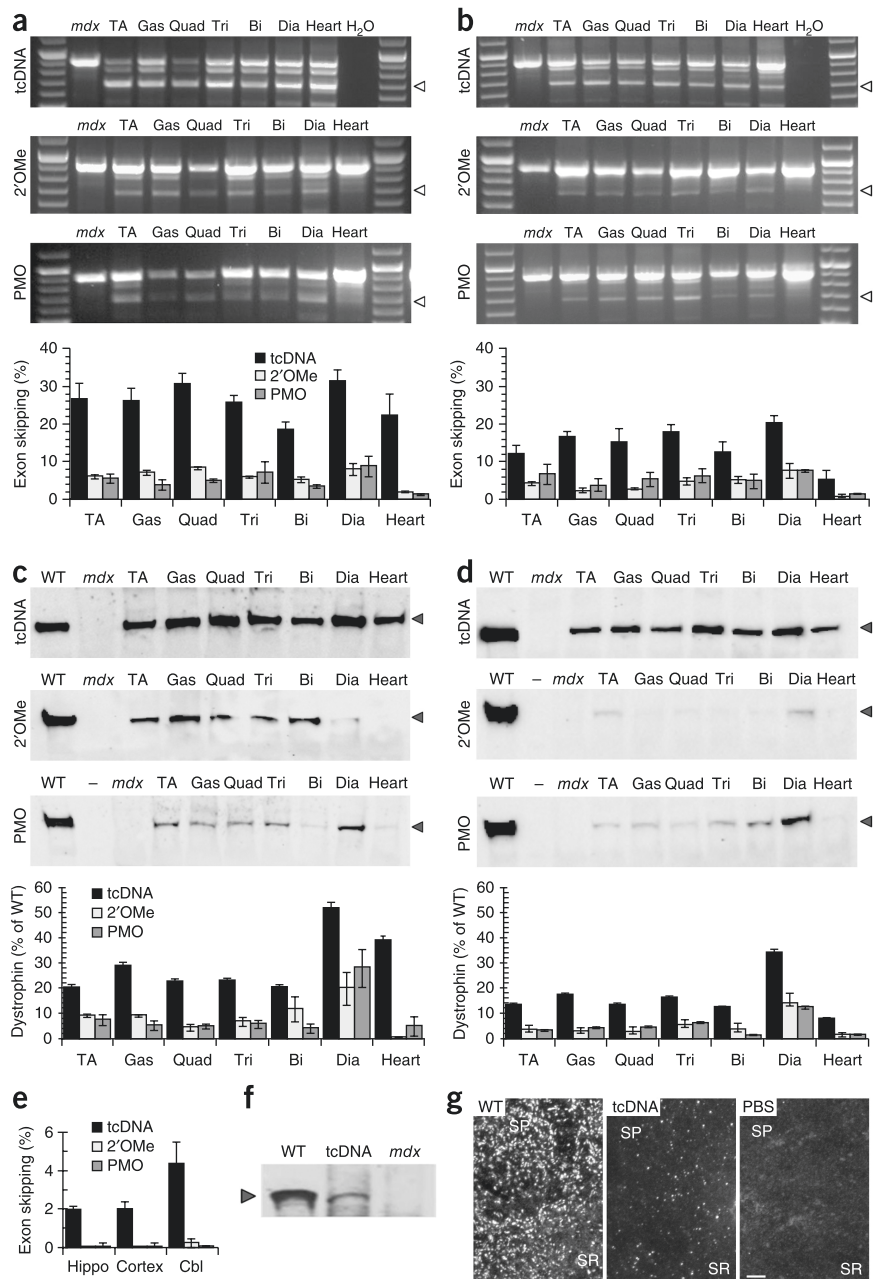
(Fig. 2e–g). Serum creatine kinase (CK), a marker for muscle damage, was reduced in all mice treated with AON at high doses, but more notably with tcDNA. Studies of blood urea and creatinine showed slightly elevated values with both tcDNA and 2'OMe treatments, which are suggestive of a dose-dependent accumulation of drug in kidney proximal tubules and associated toxicities seen with most oligonucleotide drugs (Supplementary Fig. 4).

The physiological properties were studied by measuring maximal specific force and resistance to eccentric contraction-induced damage, which is an indicator of the structural integrity of muscle fibers (Fig. 3a). Tibialis anterior (TA) muscles from control *mdx* mice displayed a reduced maximal specific force compared to WT and were unable to sustain tetanic tension, falling to 35% of their initial force after nine eccentric contractions. In contrast, TA muscles from tcDNA-treated mice following either dosing regimen (200 or 80 mg/kg/week), displaying 20% and 12% rescued dystrophin, respectively (compared to WT expressing 100%; Fig. 2c,d), showed essentially normalized specific force and maintained 80% and 55%, respectively, of their force following the eccentric contractions (Fig. 3a and Supplementary Fig. 5). Moreover, tcDNA treatment resulted in a clear dose-dependent response improvement of the maximal specific force (Fig. 3a).

Very few studies have investigated respiratory function in *mdx* mice, even though the improvement of this vital parameter represents an indispensable requisite for a life-improving therapy, as respiratory failure is a major cause of death amongst patients with DMD²⁰. Consistent with a severely dystrophic diaphragm, *mdx* mice showed measurable respiratory dysfunction when undergoing whole-body plethysmography. Compared to age-matched WT controls, *mdx* mice presented discrepancies for a number of parameters (Fig. 3b and Supplementary Fig. 6). We found that tcDNA-treated *mdx* mice, all of which expressed at least 50% of WT dystrophin function in their diaphragms, had improved respiratory function, as reflected by the normalization of the peak expiratory flow (PEF), the end expiratory pause (EEP), the minute volume normalized to body weight (MV/BW), the enhanced pause (penh), as well as the ratio of mean inspiratory flow expressed by tidal volume (TV) to inspiratory time (TI) normalized to body weight (TV/TI/BW). Mice treated with 2'OMe and PMO, displaying only 20% and 28% of WT dystrophin expression in their diaphragms, respectively, also showed some respiratory improvement but to a lesser extent, underlining the correlation between dystrophin rescue and improved respiratory function.

Figure 2 Direct comparison of tcDNA, 2'OMe or PMO effect on exon skipping and dystrophin rescue. **(a,b)** Detection of exon 23-skipped dystrophin mRNA in *mdx* muscles after systemic delivery of tcDNA, 2'OMe and PMO at 200 mg/kg/week **(a)** or an equimolar dose of 15 μ mol/kg/week **(b)** corresponding to 80, 100 and 125 mg/kg/week, respectively.

The 688-bp fragment corresponding to the exon 23-skipped mRNA is detected by nested RT-PCR (blots) and indicated with arrowheads. Left- and rightmost lanes hold size standards. Exon 23-skipped mRNA was quantified and expressed as the percentage of total dystrophin mRNA produced by the same mice (shown in graphs below gels). $n = 4$ mice per group; error bars are \pm sem. **(c,d)** Western blot showing dystrophin expression (gray arrowheads) in different muscles from treated mice at 200 mg/kg/week **(c)** or equimolar dose **(d)** compared to *mdx* and WT control mice. 100 μ g of total protein was loaded for treated samples and 25 μ g for wild-type (WT). Below, diagrams depict quantification of dystrophin expressed as a percentage of WT expression, after normalization with total protein loading. $n = 4$ per group; error bars are \pm sem. **(e)** Quantification of exon 23 skipping in hippocampus (hippo), cortex and cerebellum following IV injection of 200 mg/kg/week of tcDNA, 2'OMe or PMO for 12 weeks. **(f)** Detection of restored dystrophin (gray arrowhead) in the cerebellums from tcDNA-treated *mdx* mice, compared with WT and untreated *mdx* mice. 120 μ g of total protein were loaded for the tcDNA and control *mdx* samples and 20 μ g for the WT control. All Western blots shown are representative of four treated mice. **(g)** Dystrophin immunostaining in WT (left), tcDNA-treated (200 mg/kg/week, middle) and PBS-injected control (right) *mdx* mice in the stratum pyramidale (SP) and proximal stratum radiatum (SR) of the CA1/CA2 hippocampus. Scale bar, 5 μ m.



We next evaluated the cardiac function by echocardiography, which highlighted significant differences between *mdx* and WT control mice, even though the examined mice were younger than the typical age at which *mdx* mice show major cardiac defects. In this context, we found that tcDNA treatment of 200 mg/kg/week for 12 weeks, which restored about 40% of WT dystrophin expression in the heart, improved ejection fraction and shortening fraction (the gold standard for evaluation of cardiac systolic function^{21,22}) (Fig. 3c). Interestingly, the lower dose of tcDNA (80 mg/kg/week for 12 weeks), inducing only about 8% of WT dystrophin expression, did not correct cardiac function.

In the brain, dystrophin (427 kDa) is found in inhibitory GABAergic synapses of Purkinje cells of the cerebellum and in principal neurons of the hippocampus, cortex and amygdala²³. Concurring with cognitive deficits and psychiatric symptoms often observed in patients with DMD, an enhanced defensive behavior in response to a threat has been reported in *mdx* mice that is independent of motor, respiratory or cardiac defects but rather is controlled by central mechanisms^{24,25}. Because some level of exon skipping and dystrophin rescue could be detected in the CNS following tcDNA treatment, we measured the duration

of tonic immobility (freezing) that resulted from a restraint-induced fear response, which represents a highly reproducible behavioral phenotype of *mdx* mice. Typically, within a 5-min observational period, control *mdx* mice spent about 70% of the time freezing in response to this acute stress in contrast to only 20% for WT mice. 2'OMe- and PMO-treated groups behaved very similarly to *mdx* controls (Fig. 3d), but tcDNA treatment at 200 mg/kg/week for 12 weeks completely reverted the *mdx* phenotype: the freezing time, distance traveled and vertical activity (number of ups, i.e., rearings and leanings) during the 5-min testing period were no different from WT levels (Fig. 3d and Supplementary Fig. 7).

Finally, we investigated the therapeutic benefit of tcDNA in the *Utrn* (encoding utrophin) and *Dmd* double knockout (*Utrn*^{tm1Ked}*Dmd*^{mdx}, known hereafter as dKO) mouse model, which develops a much more severe muscular dystrophy than the *mdx* model^{26,27}. Four-week-old dKO mice were treated with weekly IV injections of 200 mg/kg of

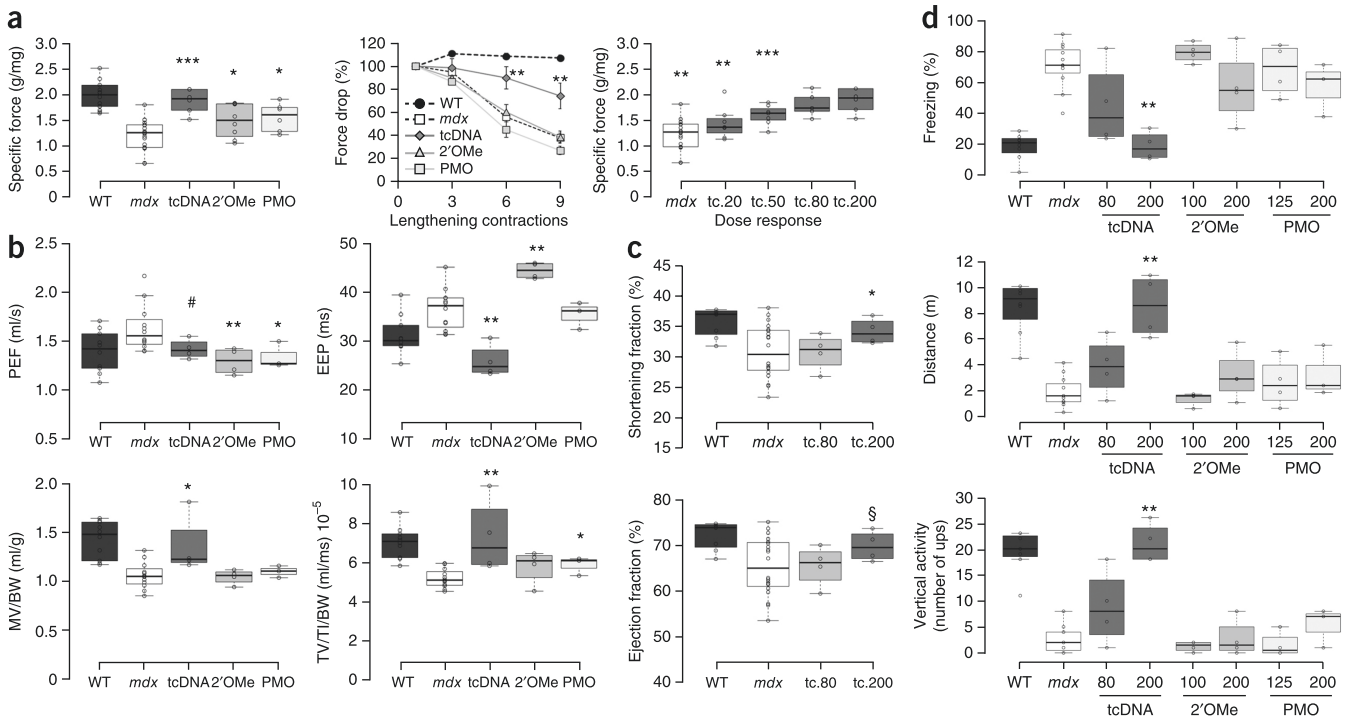


Figure 3 Systemic delivery of tcDNA improves the *mdx* phenotype. **(a)** TA muscles of *mdx* mice treated with 200 mg/kg/week of tcDNA, 2'OMe or PMO were analyzed for their maximal specific force (left) and percentage of force drop following a series of three to nine eccentric contractions (middle). The maximal specific force was also measured in *mdx* mice treated with various doses of tcDNA (20, 50, 80 and 200 mg/kg/week) (right). $n = 5$ for tc.80; 6 for tc.20, tc.200 and PMO.200; 7 for tc.50; 8 for 2'OMe.200; 14 for *mdx*; 22 for WT; error bars are \pm sem; *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ compared to *mdx* control mice (Mann–Whitney *U* tests). **(b)** Respiratory function in *mdx* mice treated with 200 mg/kg of tcDNA, 2'OMe or PMO for 12 weeks ($n = 4$ per group except for PMO $n = 3$), compared to *mdx* control ($n = 12$) and WT mice ($n = 10$). PEF, EEP, MV and TV/TI/BW are shown. Error bars are mean \pm sem; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, # $P = 0.052$ compared to *mdx* control mice (Mann–Whitney *U* tests). **(c)** Left ventricular function, i.e., shortening and ejection fractions of myocardiums of WT, *mdx* control and *mdx* mice treated with 80 or 200 mg/kg/week of tcDNA. * $P < 0.05$ and § $P = 0.07$ compared to *mdx* control mice (*t*-test for heteroscedastic variables). Error bars are \pm sem; $n = 4$ treated mice per group. **(d)** Restraint-induced unconditioned fear responses expressed as a percentage of freezing time, horizontal (i.e. distance run in 5 min) and vertical activity. ** $P < 0.01$ (Mann–Whitney *U* tests); $n = 4$ per treated group except for PMO.200 $n = 3$; $n = 11$ for *mdx*; $n = 8$ for WT; error bars \pm sem. For box plots: center horizontal lines, medians; box limits, the 25th and 75th percentiles; whiskers, 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles; open circles, individual data points.

tcDNA over a period of 5–20 weeks. Exon skipping and dystrophin rescue were analyzed 2 weeks after the end of the treatment and correlated with treatment duration (Fig. 4a,b). As observed in *mdx* mice, exon skipping was also detected in the brains of dKO mice, confirming this unique property of tcDNA. Notably, dystrophin rescue was particularly high in heart, reaching 53% of WT levels, as confirmed by immunostaining (Fig. 4c). We found that tcDNA treatment nearly normalized serum CK levels and muscle function in dKO mice, as determined by grip strength, maximal specific force and resistance to eccentric contractions (Fig. 4). In contrast to *mdx* mice, dKO mice displayed a very severe dystrophic phenotype, including abnormal waddling gait, contracted and stiff limbs, and pronounced kyphosis (Fig. 4d). The muscle wasting affected mouse mobility considerably, especially during the last few weeks of life (Supplementary Video 1). The appearance (Fig. 4d) and behavior (Supplementary Video 2) of tcDNA-treated dKO mice were strikingly different from those of control dKO mice, and the treated mice appeared greatly improved (minimal kyphosis and contracted limbs). Mobility, food-seeking behavior, and turgor of the tail were also markedly improved and appeared close to those of unaffected mice. To measure mobility improvement of treated dKO mice, open-field behavioral activity was quantified and revealed longer periods of activity and higher distance traveled as compared to untreated mice (Fig. 4e).

All together, these results indicate that the tcDNA chemistry may represent a new avenue for the synthesis of novel exon-skipping drugs for DMD and other multisystemic disorders. The mechanisms responsible for the enhanced activity of tcDNA are not fully understood, even though we show here that tcDNA oligonucleotides have a higher propensity to spontaneously self-assemble into nanoparticles compared to the other chemistries. Even though oligonucleotide multimerization has been shown to enhance cellular internalization²⁸, it is not known whether self-assembly of tcDNA is maintained *in vivo* and thereby responsible for increased potency. Alternatively, tcDNA as nanoparticles or free AONs might bind naturally to appropriate, but not yet identified, carriers in the bloodstream, allowing them to cross endothelial barriers more efficiently. A further crucial feature of the tcDNA chemistry is that this compound displays higher RNA binding than 2'OMe and PMO¹², thus permitting the use of AONs of decreased length. The use of shorter AONs makes it possible to administer smaller amount of synthetic nucleotides without compromising biological effect, although this potentially increases the probability for off-target binding sites which will need to be studied further.

The efficacy that we report here for PMO appears lower than in previous studies. This discrepancy could be due either to more stringent quantification methods or to a suboptimal dosing regimen of PMO or

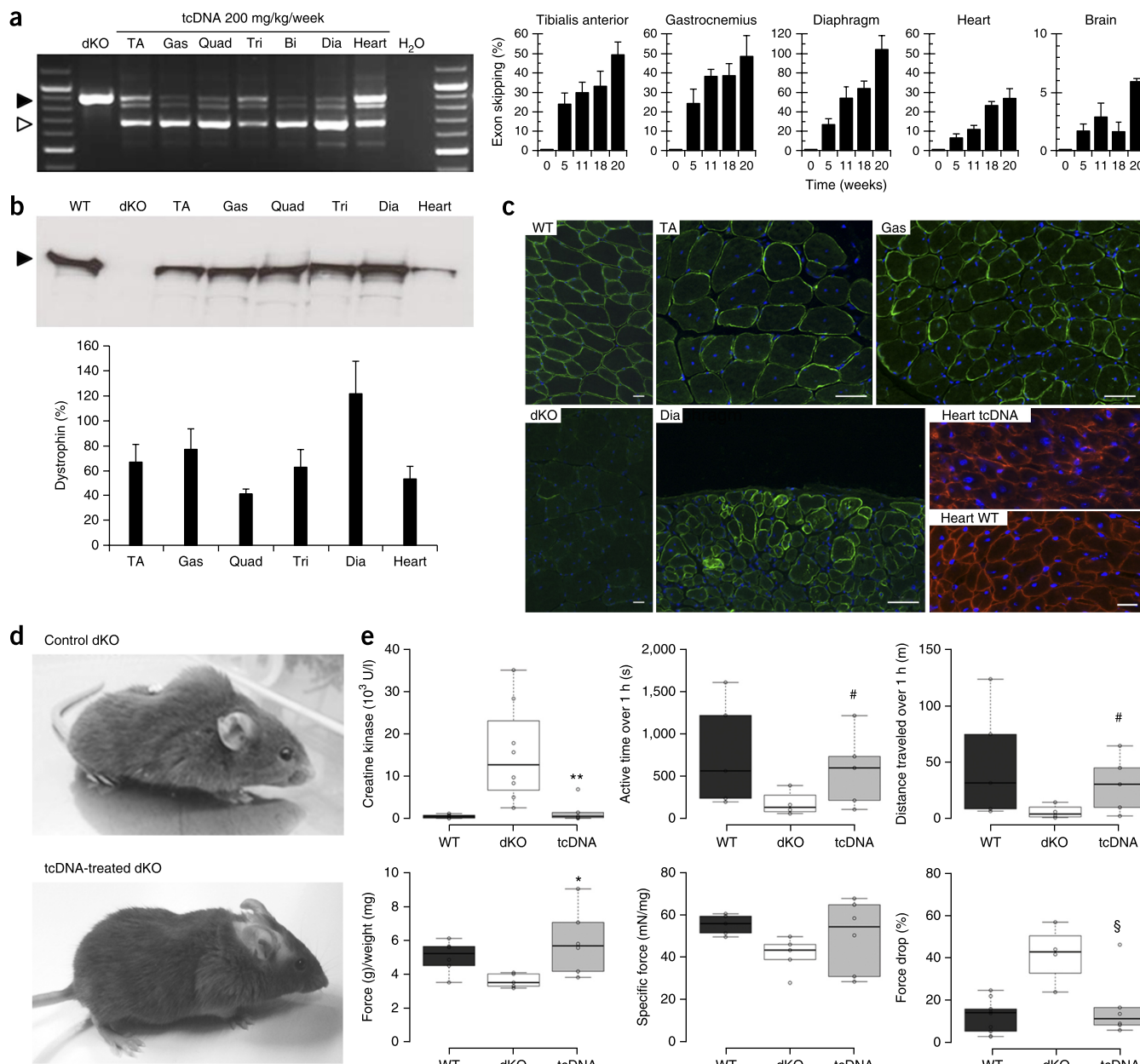


Figure 4 Rescue of the severely affected dKO mouse model after IV delivery of tcDNA. (a) Detection of exon 23–skipped dystrophin mRNA (688 bp; white arrowhead) and unskipped dystrophin (black arrowhead) in dKO muscles after systemic tcDNA delivery at 200 mg/kg/week for 20 weeks. On the right, percentage of exon skipping is quantified by Taqman qPCR in different tissues after variable weeks of treatment. (b) Western blot showing dystrophin expression (arrowhead) in different muscles from tcDNA-treated mice compared with dKO and WT control mice. Arrowhead indicates the full-length dystrophin detected in WT muscle, for comparison. 100 μ g of total protein were loaded for treated samples and 50 μ g for WT. Below, quantification of dystrophin levels from various muscles, expressed as a percentage compared to WT tissue, after normalization with total protein loading. (c) Dystrophin immunostaining on transverse sections from muscles of treated dKO. Nuclei, blue (DAPI); skeletal muscles, green; heart, red. Scale bars, 50 μ m. (d) Photograph of a control dKO mouse at 10 weeks of age (top), displaying strong kyphosis and joint contractures compared to an age-matched, tcDNA-treated littermate (bottom). Treatment was initiated at 3 weeks of age. (e) Functional rescue of the dKO phenotype. Serum CK, grip strength, specific force (not significant), force drop following a series of five eccentric contractions, active time and distance traveled over 1 h are displayed. $\$P = 0.055$, $\#P = 0.086$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, compared to untreated dKO mice (Mann–Whitney U tests). Error bars are \pm sem. $n = 7$ for CK; $n = 6$ for grip strength, specific force and force drop; $n = 5$ for activity monitoring.

2'OMe, which are more potent following administration of multiple low doses^{29–31}. A similar effect could also occur for tcDNA, especially considering its long lasting activity, and regimens designed to balance the possibility of toxicity due to chronic exposure to high levels of AONs may lead to disease-ameliorating levels of dystrophin. When

such an approach was used in *mdx* mice (4 weeks at 200 mg/kg/week followed by 8 weeks at 50 mg/kg/week), levels of exon skipping and dystrophin restoration were comparable to those found in mice treated at 200 mg/kg/week over 12 weeks (**Supplementary Fig. 8**). However, the promise of tcDNA still crucially depends on how well

it will be tolerated by humans. No obvious toxic effects were observed at any dosage during the course of our experiments (with respect to clinical observations, organ weights and macroscopic observations at necropsy), although the risk of different tolerance between mouse and man still exists.

In conclusion, our study evidences for the first time an exon-skipping strategy that enables dystrophin rescue in all tissues affected by the lack of dystrophin (including skeletal muscles, heart and CNS) following IV administration of AONs. Importantly, this dystrophin rescue translated into functional improvements in a mouse model of DMD, especially of the cardio-respiratory system and certain behavioral aspects, whose dysfunctions now appear to be reversible. While full toxicology studies are still pending to confirm the tolerability of tcDNA-AONs, these very properties make them particularly attractive as potential therapies for genetic diseases eligible for exon-skipping approaches.

METHODS

Methods and any associated references are available in the [online version of the paper](#).

Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the online version of the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank P.O. Buclez for technical assistance as well as D. Staunton and the Biophysical Instrumentation Facility at the University of Oxford for help with the SEC-MALS experiment. We also thank S. Vinit, A. Jacquet and N. Mougout for assistance with the plethysmography and echocardiography experiments, and D. Mornet (INSERM, Montpellier) for the dystrophin-specific primary antibody 5G5. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (Chair of Excellence HandiMedEx), the Association Monegasque Contre les Myopathies, the Duchenne Parent Project France, the aktion Benni & Co. and the UK Medical Research Council.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.G., S.E.A., K.E., T.V., S.S., M.J.A.W., K.E.D., C.V., C.L. and L.G. participated in the planning, design and interpretation of experiments. A.G., G.G., A.B., S.E.A., K.E., A.A., R.C., B.D., A.F., C.B., H.A. and C.V. carried out experiments. A.G. and L.G. wrote the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare competing financial interests: details are available in the [online version of the paper](#).

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

- Goemans, N.M. *et al.* Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1513–1522 (2011).
- Cirak, S. *et al.* Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet* **378**, 595–605 (2011).
- Koenig, M. *et al.* 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 (1987).
- Muntoni, F., Torelli, S. & Ferlini, A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* **2**, 731–740 (2003).
- Emery, A.E. The muscular dystrophies. *Lancet* **359**, 687–695 (2002).
- Bresolin, N. *et al.* Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* **4**, 359–369 (1994).
- Mendell, J.R. *et al.* Eteplirsin for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* **74**, 637–647 (2013).
- Lu, Q.L., Cirak, S. & Partridge, T. What can we learn from clinical trials of exon skipping for DMD? *Mol. Ther. Nucleic Acids* **3**, e152 (2014).
- Townsend, D., Yasuda, S.L., Chamberlain, J.S. & Metzger, J.M. Emergent dilated cardiomyopathy caused by targeted repair of dystrophic skeletal muscle. *Mol. Ther.* **16**, 832–835 (2008).
- Renneberg, D. & Leumann, C.J. Watson-Crick base-pairing properties of tricyclo-DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 5993–6002 (2002).
- Ittig, D., Gerber, A.B. & Leumann, C.J. Position-dependent effects on stability in tricyclo-DNA modified oligonucleotide duplexes. *Nucleic Acids Res.* **39**, 373–380 (2011).
- Renneberg, D., Bouliong, E., Reber, U., Schumperli, D. & Leumann, C.J. Antisense properties of tricyclo-DNA. *Nucleic Acids Res.* **30**, 2751–2757 (2002).
- Ivanova, G. *et al.* Tricyclo-DNA containing oligonucleotides as steric block inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 tat-dependent trans-activation and HIV-1 infectivity. *Oligonucleotides* **17**, 54–65 (2007).
- Murray, S. *et al.* TricycloDNA-modified oligo-2'-deoxyribonucleotides reduce scavenger receptor B1 mRNA in hepatic and extra-hepatic tissues—a comparative study of oligonucleotide length, design and chemistry. *Nucleic Acids Res.* **40**, 6135–6143 (2012).
- Nel, A.E. *et al.* Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.* **8**, 543–557 (2009).
- Sicinski, P. *et al.* The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* **244**, 1578–1580 (1989).
- Mann, C.J., Honeyman, K., McClorey, G., Fletcher, S. & Wilton, S.D. Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy. *J. Gene Med.* **4**, 644–654 (2002).
- Alter, J. *et al.* Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nat. Med.* **12**, 175–177 (2006).
- Heemskerck, H.A. *et al.* In vivo comparison of 2'-O-methyl phosphorothioate and morpholino antisense oligonucleotides for Duchenne muscular dystrophy exon skipping. *J. Gene Med.* **11**, 257–266 (2009).
- Kohler, M. *et al.* Quality of life, physical disability, and respiratory impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **172**, 1032–1036 (2005).
- Quinlan, J.G. *et al.* Evolution of the mdx mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings. *Neuromuscul. Disord.* **14**, 491–496 (2004).
- Spurney, C.F. *et al.* Dystrophin-deficient cardiomyopathy in mouse: expression of Nox4 and Lox are associated with fibrosis and altered functional parameters in the heart. *Neuromuscul. Disord.* **18**, 371–381 (2008).
- Perronnet, C. & Vaillend, C. Dystrophins, utrophins, and associated scaffolding complexes: role in mammalian brain and implications for therapeutic strategies. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 849426 (2010).
- Sekiguchi, M. *et al.* A deficit of brain dystrophin impairs specific amygdala GABAergic transmission and enhances defensive behaviour in mice. *Brain* **132**, 124–135 (2009).
- Yamamoto, K. *et al.* Reduction of abnormal behavioral response to brief restraint by information from other mice in dystrophin-deficient mdx mice. *Neuromuscul. Disord.* **20**, 505–511 (2010).
- Deconinck, A.E. *et al.* Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **90**, 717–727 (1997).
- Grady, R.M. *et al.* Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **90**, 729–738 (1997).
- Wu, C.C. *et al.* Selection of oligonucleotide aptamers with enhanced uptake and activation of human leukemia B cells. *Hum. Gene Ther.* **14**, 849–860 (2003).
- Malerba, A., Thorogood, F.C., Dickson, G. & Graham, I.R. Dosing regimen has a significant impact on the efficiency of morpholino oligomer-induced exon skipping in mdx mice. *Hum. Gene Ther.* 955–965 (2009).
- Malerba, A. *et al.* Chronic systemic therapy with low-dose morpholino oligomers ameliorates the pathology and normalizes locomotor behavior in mdx mice. *Mol. Ther.* **19**, 345–354 (2011).
- Verhaart, I.E. *et al.* Dose-dependent pharmacokinetic profiles of 2'-O-methyl phosphorothioate antisense oligonucleotides in mdx mice. *Nucleic Acid Ther.* **23**, 228–237 (2013).

ONLINE METHODS

Antisense oligonucleotides and animal experiments. We compared tcDNA antisense oligonucleotides (AONs) to two other chemistries of AON (2'OMe and PMO) in this study. All experiments with 2'OMe and tc-DNA AONs were done in their phosphorothioate form. All AONs target the donor splice site of exon 23 of the mouse dystrophin pre-mRNA. The most efficient sequence was chosen for all chemistries from previously reported studies^{17–19}: tcDNA-PS M23D (+2–13) (5'-pAACCTCGGCTTACCT-3') (SYNTHENA, Bern, Switzerland), 2'OMePS (+7–13) (5'-GGCCAAACCUCGGCUUACCU-3') (Eurogentec) and PMO (+7–18) (5'-GGCCAAACCCTCGGCTTACCTGAAAT-3') (Gene Tools LLC, Corvallis, OR). All procedures were performed in accordance with national and European legislation, approved by the French government (ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche). All *mdx* experiments were carried out at the Centre d'évaluation fonctionnelle, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France. Adult *mdx* mice (*mdx*, C57BL/10ScSc-Dmd^{mdx/j}), 6–8 week old females) were injected intravenously in the retro-orbital sinus or subcutaneously once a week with AONs as indicated in the Results section, and under general anesthesia using isoflurane. DKO mice were generated by crossing *Utrn*^{+/-}*Dmd*^{+/-} mice, which had been obtained by crossing the *Utrn*^{+/-} mice with *mdx* mice. tcDNA was delivered to dKO mice under general anesthesia at a dose of 200 mg/kg/week by IV injections alternated between the tail vein and subcutaneous delivery. All dKO experiments were carried out in Biomedical Science Building, University of Oxford, Oxford, UK and performed according to the guidelines and protocols approved by the home office. Blood samples were collected from tail bleeds under general anesthesia. Analyses of serum creatine kinase (CK), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels were performed by the pathology laboratory at Mary Lyon Centre, Medical Research Council, Harwell, Oxfordshire, UK.

Treated mice were killed at various time points, as indicated in the Results section, and muscles and tissues were harvested and snap-frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane and stored at -80 °C before further analysis. Sample sizes and *n* values are indicated in each figure legend. Investigators were blinded for behavioral studies only. The experiments were not randomized.

Nanotracking analysis (NTA), electron microscopy and size-exclusion chromatography with multi-angle static light scattering (SEC-MALS). The NS500 nanoparticle analyzer (NanoSight, Amesbury, UK) was used to measure the size distribution and number of particles formed with tcDNA, 2'OMePS RNA or PMO. All AONs were dissolved in PBS at 200 μM concentration. PMO and 2'OMePS RNA were diluted 10 times before analysis, whereas the tcDNA was diluted 100,000 times due to the high number of particles. Samples were loaded into the NS500, and the number of particles and their movement was recorded at room temperature for 60 s, repeated 5 times for each sample and analyzed using the NS500 software.

Nanoparticle formation was also analyzed by electron microscopy. Different oligonucleotide chemistries, at concentrations of 370 μM, were mounted on Formvar/carbon coated 200 mesh nickel grids (Agar Scientific, UK), then negatively stained using an aqueous solution of uranyl acetate and visualized using a JEOL 1010 transmission electron microscope (JEOL, Peabody, MA, USA) at 50,000× magnification. SEC-MALS experiments were performed with a Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare) equilibrated in PBS on an AKTA system. The column was followed in-line by a DAWN HELEOS-II light scattering detector (Wyatt Technologies) and an Optilab-rEX refractive index monitor (Wyatt Technologies). Molecular mass calculations were performed using ASTRA Version 5.3.4.14 (Wyatt Technologies).

Quantification of tcDNA by LC/MS/MS. Intervening sections were collected during cryosection of the frozen muscles and tissues and were homogenized to a concentration of 50 mg/ml in proteinase K buffer (100 mmol/liter Tris-HCl, pH 8.5, 200 mmol/liter NaCl, 5 mmol/liter EDTA, 0.2% sodium dodecyl sulfate) containing 2 mg/ml of proteinase K (Invitrogen), followed by incubation for 2 h (liver) or 4 h (kidney, heart and skeletal muscle) rotating at 55 °C in a hybridization oven. Next, the samples were centrifuged for 15 min at maximum speed and the supernatant was used in the assay.

Quantification of tcDNA in the musculus tibialis anterior (TA), gastrocnemius (Gas), quadriceps femoris (Quad), triceps brachialis (Tri), biceps brachialis (Bi),

diaphragm (Dia), heart, brain, cerebellum (Cbl), liver and kidney was performed by LC/MS/MS analysis on a Dionex UltiMate 3000 RSLC system (Thermo Fisher Scientific) coupled to a QTRAP 5500 electrospray mass spectrometer (AB Sciex). The instrument was operated in the negative ion multiple reaction monitoring (MRM) mode (capillary potential -4.5 kV, source temperature 550 °C). Chromatographic separations were carried out on a XBridge OST C₁₈ 2.5 μm, 2.1 × 50 mm reversed-phase column (Waters) with gradient elution using 100 mmol/l 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol and 8.6 mmol/l triethylamine in water as eluent A and methanol as eluent B. Gradient elution was performed with a flow rate of 250 μl/min, starting with 10% of eluent B and linearly increasing to 20% within 1 min, followed by an increase to 40% within the next 8 min. The column temperature was kept at 50 °C throughout the analyses. tcDNA of the identical sequence but exhibiting a phosphodiester backbone was used as the internal standard (IS).

Samples were prepared for LC/MS/MS analysis by solid phase extraction (SPE) on Oasis HLB cartridges (Waters) packed with 10 mg of sorbent. The cartridges were preconditioned with 1 ml of methanol followed by 2 × 0.5 ml of HPLC-eluent A. 25 μl of the supernatant from centrifugation were spiked with 25 μl of internal standard solution (1.8 mg of IS in 1 ml of 100 mmol/l triethylammonium bicarbonate). Samples were kept at room temperature for 30 min to ensure ion-pair formation between oligonucleotides and triethylammonium ions. Subsequently, 50 μl of eluent A were added and the samples were loaded on the SPE cartridges and washed twice with 250 μl of eluent A and once with 300 μl of triethylammonium bicarbonate (100 mmol/l). Elution of the oligonucleotides was performed using 2 × 200 μl of a solution of 40% eluent A in methanol, followed by 150 μl of methanol. The sample volume was reduced to approximately 50 μl in a Speedvac concentrator and reconstituted to 200 μl with eluent A before analysis.

Determination of the concentrations of tcDNA and the 5'-dephosphorylated tcDNA (5'-OH-tcDNA) is based on the peak area ratios $A_{\text{Analyte}}/A_{\text{IS}}$ for the following MRM transitions: tcDNA [M-7H]⁷⁻ → w₁⁻ (m/z 765.2 → m/z 375.3), tcDNA [M-6H]⁶⁻ → w₁⁻ (m/z 892.9 → m/z 375.3), 5'-OH-tcDNA [M-7H]⁷⁻ → w₁⁻ (m/z 753.8 → m/z 359.2), 5'-OH-tcDNA [M-6H]⁶⁻ → w₁⁻ (m/z 879.6 → m/z 359.2), IS [M-7H]⁷⁻ → w₁⁻ (m/z 733.3 → m/z 359.2) and IS [M-6H]⁶⁻ → w₁⁻ (m/z 855.4 → m/z 359.2). Calibration was based on serial dilution of tcDNA in eluent A (spiked with internal standard (IS); tcDNA of the identical sequence, but exhibiting a phosphodiester backbone) over a concentration range of 50–1,000 ng/ml.

RNA analysis. Total RNA was isolated from intervening muscle sections collected during cryosection using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, UK). Aliquots of 500 ng of total RNA were used for RT-PCR analysis using the Access RT-PCR System (Promega) in a 50 μl reaction using the external primers Ex 20Fo (5'-CAGAATCTGCCAATTGCTGAG-3') and Ex 26Ro (5'-TTCTTCAGCTTGTCATCC-3'). The cDNA synthesis was carried out at 45 °C for 45 min, directly followed by the primary PCR of 30 cycles of 95 °C (30 s), 55 °C (1 min) and 72 °C (2 min). 2 μl of these reactions were then re-amplified in nested PCRs by 22 cycles of 95 °C (30 s), 55 °C (1 min) and 72 °C (2 min) using the internal primers Ex 20Fi (5'-CCCAGTCTACCACCCTATCAGAGC-3') and Ex 26Ri (5'-CCTGCCTTAAGGCTTCCTT-3'). PCR products were analyzed on 2% agarose gels.

Exon 23 skipping was also measured by Taqman quantitative RT-PCR as previously described³². RNA was isolated from mouse tissue as described above. Contaminating DNA was removed from the RNA preparations using the Turbo DNA-free system (Ambion). 1 μg aliquots of DNase-treated RNA were then subjected to reverse transcription using the First Strand synthesis system (Invitrogen) with random hexamers according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed using Taqman assays that were designed against the exon 4–5 or exon 22–24 templates using the Custom Assay Design Tool (Life Technologies, primer/probe sequences available upon request). An inventoried 18S assay was used as an endogenous control (Life Technologies, 4310893E). 50 ng of cDNA was used as input per reaction and all assays were carried out in singleplex. Assays were performed under fast cycling conditions on an Applied Biosystems StepOne Plus thermocycler, and all data were analyzed using the comparative Ct method using the associated StepOne

analytical software. For a given sample the delta-Ct values of exon 4–5 and exon 22–24 assays were used to calculate a relative abundance of total dystrophin and exon 23–skipped dystrophin mRNA, respectively. Exon 23 skipping was then expressed as a percentage against total dystrophin, as indicated by the exon 4–5 expression level.

Western blot and Immunohistochemistry analysis. Protein extracts were obtained from pooled muscle sections treated with 125 mmol/l sucrose, 5 mmol Tris-HCl pH 6.4, 6% of MOPS SDS Running buffer (Invitrogen), 10% SDS, 10% glycerol, and 5% β -mercaptoethanol. The samples were purified with the Compt-Able Protein Assay preparation reagent set (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL) and the total protein concentration was determined with the BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific Pierce). Samples were denatured at 95 °C for 5 min and 100 μ g of protein were loaded onto Mini-Protean TGX stain-free gels 4–15% (Bio-Rad), following manufacturer instructions. Dystrophin protein was detected by probing the membrane with 1:50 dilutions of NCL-DYS1 primary monoclonal antibody (NCL-DYS1; Novocastra, Newcastle, UK), followed by incubation with a sheep anti-mouse secondary antibody (horseradish peroxidase conjugated; 1:15,000) and ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare). Membranes were converted to numerical pictures by scanning and band intensities were analyzed using the ImageJ 1.46r software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) and normalized to total protein content quantified with the stain-free technology (Bio-Rad).

Sections of 10 μ m were cut from at least two-thirds of the muscle length of the various tissues (tibialis anterior, gastrocnemius, quadriceps femoris, biceps brachialis, triceps brachialis, diaphragm, and cardiac muscle) at 100 μ m intervals. The intervening muscle sections were collected for RNA analysis, LC/MS/MS and western blot analysis. The cryosections were examined for dystrophin expression using the rabbit polyclonal antibody Dystrophin (dilution 1:500; cat. number RB-9024-P ThermoScientific), which was then detected by goat-anti-rabbit IgGs Alexa 488 (dilution 1:1000; cat. number A11070 - Invitrogen).

Brain fresh-frozen cryosections of 30 μ m were collected onto Superfrost+ slides, thawed for 2 min at room temperature (RT), fixed in acetone/methanol (1:1) for 5 min at –20 °C, washed in phosphate-buffered saline, incubated first in a blocking solution for 45 min (10% normal goat serum, 0.3% Triton X-100, 1% bovine serum albumin), then overnight at 4 °C with a monoclonal anti-dystrophin primary antibody (5G5; gift from D. Mornet, INSERM, Montpellier, France; dilution: neat), washed and incubated with secondary antibody conjugated to Cy3 (1:500, 1 h, RT). Controls prepared by omitting primary antibody showed no specific staining. Images were taken at equivalent locations and exposure times using a laser scanning confocal microscope (Zeiss LSM 700, $\times 40$ objective). Stacks of 7–8 images (1,024 \times 1,024 px) spaced by 1 μ m were recorded at a magnification of 156 nm/pixel.

Muscle function analysis. Muscle function of *mdx* mice was evaluated by measuring tibialis anterior muscle contraction *in situ* in response to nerve stimulation, as described previously. Mice were anesthetized using pentobarbital (60 mg/kg intraperitoneally). Body temperature was maintained at 37 °C using radiant heat. The knee and foot were fixed with pins and clamps, and the distal tendon of the muscle was attached to the lever arm of a servo-motor system (305B; Dual-Mode Lever; Aurora Scientific) using a silk ligature. The sciatic nerve was crushed proximally and stimulated distally by a bipolar silver electrode using supramaximal 0.1 ms–duration square-wave pulses. We measured the absolute maximal isometric tetanic force (P_0) generated during isometric contractions in response to electrical stimulation (frequency 75–150 Hz, stimulation train 500 ms). P_0 was determined at L_0 (length at which maximal tension was obtained during the tetanus). Absolute maximal isometric force was normalized to muscle mass as an estimate of specific maximal force (sP_0), that is, specific force.

Fragility was estimated from the force decline resulting from lengthening contraction-induced injury. The sciatic nerve was stimulated for 700 ms (150 Hz stimulation frequency). A maximal isometric contraction of the TA muscle was initiated during the first 500 ms. Then, muscle lengthening (10% L_0) at a velocity of 5.5 mm/s was imposed during the last 200 ms. All isometric contractions were made at an initial length, L_0 . Nine lengthening contractions of the TA muscles were performed, each separated by a 60 s rest period. Maximal

isometric force was measured 1 min after each lengthening contraction and expressed as a percentage of the initial maximal isometric force. As an indicator of active muscle stiffness, we measured the increase in force during the stretch of the first lengthening contraction. This force was expressed as a percentage of P_0 .

Functional grip strength analysis was performed on treated dKO mice and control mice at 12 weeks of age using a commercial grip strength monitor (Chatillon, UK). Each mouse was held 2 cm from the base of the tail, allowed to grip a bar attached to the apparatus with their forepaws, and pulled gently until they released their grip. The force exerted was recorded from four sequential tests, averaged at 1 min apart. Specific force and force drop were measured in dKO mice from the extensor digitorum longus (EDL) muscle dissected from the hind leg of the treated and control mice. During dissection and experiments, muscles were bathed in oxygenated (95% O₂–5% CO₂) Krebs–Hensley solution composing of (mM): NaCl, 118; NaHCO₃, 24.8; KCl, 4.75; KH₂PO₄, 1.18; MgSO₄, 1.18; CaCl₂, 2.54; glucose, 10. Contractile properties were measured as previously described³³.

Respiratory function. The respiratory function of mice was evaluated by whole-body plethysmography using an EMKA technologies plethysmograph, essentially as described by TREAT-NMD (http://www.treat-nmd.eu/downloads/file/sops/dmd/MDX/DMD_M.2.2.002.pdf). Briefly, unrestrained conscious mice were placed in calibrated animal chambers and the pressure difference between the reference and animal chambers was measured using a pressure transducer. Mice were allowed to acclimate in the chambers for 45 min at stable temperature and humidity. Data were then collected every 5 s using the iox2 software (version 2.8.0.19; EMKA technologies). The inspiration time (TI) was defined as the start of inspiration to the end of inspiration and the expiration time (TE) was defined as the start of expiration to the end of expiration. The relaxation time (RT) was defined as the time from the start of expiration to the time when 65% of the total expiratory pressure occurred. Pause and penh were defined and calculated by the following formulas: Pause = (TE – RT)/RT and penh = (PEP/PIP) \times Pause, where PEP is peak expiratory pressure and PIP is peak inspiratory pressure. The value of each parameter was calculated from an average of 60 recordings of 5 s representing a total of 5 min. Inclusion criteria for each recording were >8 respiration events by 5 s and >80% of success rate as measured by the iox software.

Echocardiography. Echocardiography was performed on lightly anaesthetized mice under isoflurane (induction with 2% isoflurane–100% O₂, and maintained with 0.5–100% O₂). Non-invasive measurements of left ventricular dimensions were evaluated using echocardiography-Doppler (GE Medical System Co, Vivid 7 Dimension/Vivid7 PRO) with a probe emitting ultrasounds from 9 to 14 MHz frequency. The two-dimensionally guided Time Motion mode recording (parasternal long-axis view) of the left ventricle (LV) provided the following measurements: diastolic and systolic septal and posterior wall thicknesses, internal end-diastolic (LVEDD) and end-systolic diameters (LVESD), and heart rate. Each set of measurements was obtained from the same cardiac cycle. At least three sets of measurements were obtained from three different cardiac cycles. The shortening fraction (%) was calculated by the formula: (LVEDD–LVESD)/LVEDD \times 100. LV myocardial volume (LVV), LV end-diastolic (EDV) and end-systolic (ESV) volumes were calculated using a half ellipsoid model of the LV. From these volumes, LV ejection fraction (%) was calculated by the formula: (EDV–ESV)/EDV \times 100.

Restraint-induced unconditioned fear. Mice were handled firmly but gently using the scruff method, as for standard examination or intraperitoneal injection in laboratory mice: The mouse was restrained by a trained experimenter grasping the scruff and back skin between thumb and index fingers, whilst securing the tail between the third and little fingers and tilting the animal upside-down so that the ventral part of its body faced the experimenter. After 15 s, the mouse was released to a new cage (16 \times 28 cm, with 12 cm high walls; illumination: ~100 lx) and was then video-tracked for 5 min using the Anymaze software (Stoelting, USA). All mice were tested between 10:00 am and 1:00 pm. Unconditioned fear responses induced by this acute stress were characterized by periods of tonic immobility (freezing) during the 5 min recording period in

the novel cage. Complete immobilization of the mouse, except for respiration, was regarded as a freezing response. This was typically quantified as episodes of immobility lasting at least 1 s with a 90% immobility sensitivity (10% body motion allowed). In all experiments the percent time the mouse was freezing was calculated for group comparisons. Horizontal (i.e., the distance traveled) and vertical activity (number of ups) were also recorded. The investigator was blinded to the group allocations during the experiments.

Open field activity monitoring. The Linton AM1053 X, Y, Z IR Activity Monitors were used for open field activity monitoring of the dKO mice. Mice were acclimatized in empty cages for 90 min the day before actual data collection. The data were collected every 10 min over a 90 min period for three consecutive days. The first three of the nine recordings each day were disregarded upon analysis. 22 different activity parameters were measured for each mouse, with total distance traveled, active time and total mobile counts considered the best parameters for monitoring behavioral activity.

Statistical analyses. Data reflecting functional measurements in **Figures 3** and **4** are expressed as scatter/box plots showing group medians and percentiles as well as individual data points. For such data, experimental groups were compared using non-parametric rank sum tests (unpaired Mann–Whitney *U*-tests)

to enable robust conclusions on effects significance in case of departures from normality associated with small sample sizes. For the echocardiography study, the observed improvement following tcDNA administration in *mdx* mice (**Fig. 3c**) did not reach the level of significance with non-parametric analyses, which was likely due to the slight (but statistically significant) difference between WT and saline-treated *mdx* mice (<10%) at this age, as a cardiac phenotype is usually quantified in older *mdx* mice (≥ 6 months of age). However, data distribution in this experiment did not differ significantly from a normal distribution (Shapiro–Wilk normality test: $P > 0.4$), yet experimental groups displayed unequal variances (equal variance test: $P \leq 0.05$). Although not strictly reliable for small samples, a bilateral *t*-test for heteroscedastic variables (i.e., samples of unequal variance) was used to analyze the effect of tcDNA in this experiment. In all experiments the differences were considered significant when $P < 0.05$. No statistical method was used to predetermine sample size.

32. Goyenvalle, A. *et al.* Rescue of severely affected dystrophin/utrophin-deficient mice through scAAV-U7snRNA-mediated exon skipping. *Hum. Mol. Genet.* 2559–2571 (2012).
33. Goyenvalle, A. *et al.* Prevention of dystrophic pathology in severely affected dystrophin/utrophin-deficient mice by morpholino-oligomer-mediated exon-skipping. *Mol. Ther.* **18**, 198–205 (2010).

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary Table 1

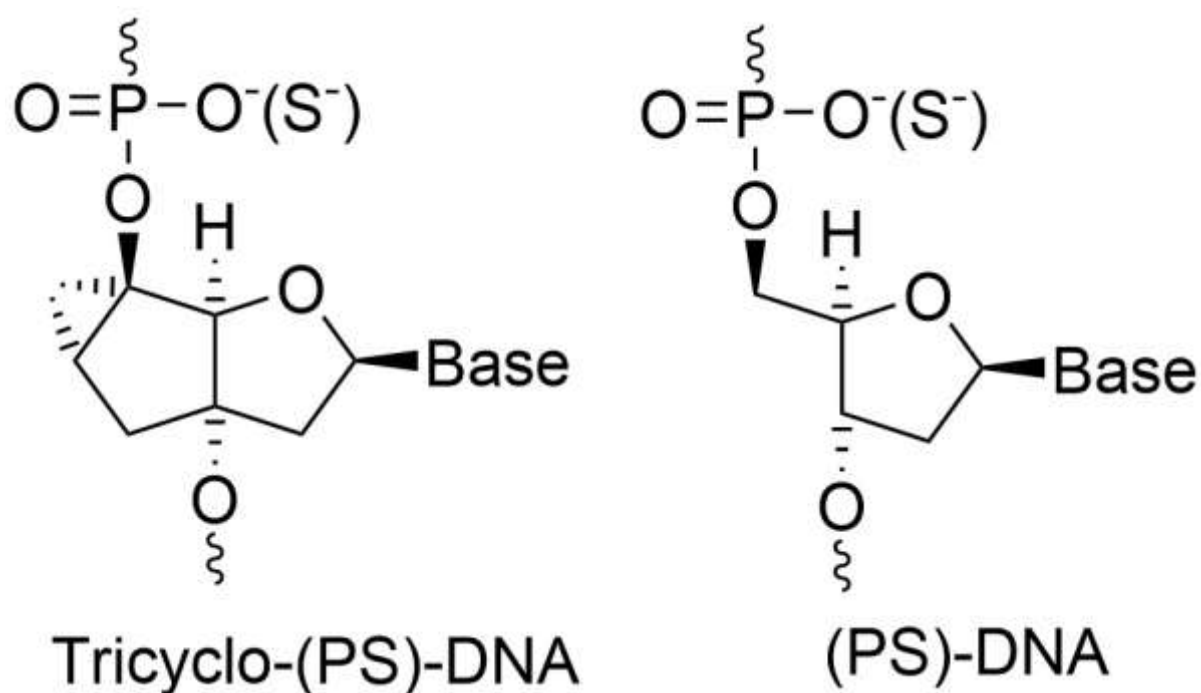
Supplementary Figures 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and legends

Supplementary Video 1, 2 legends

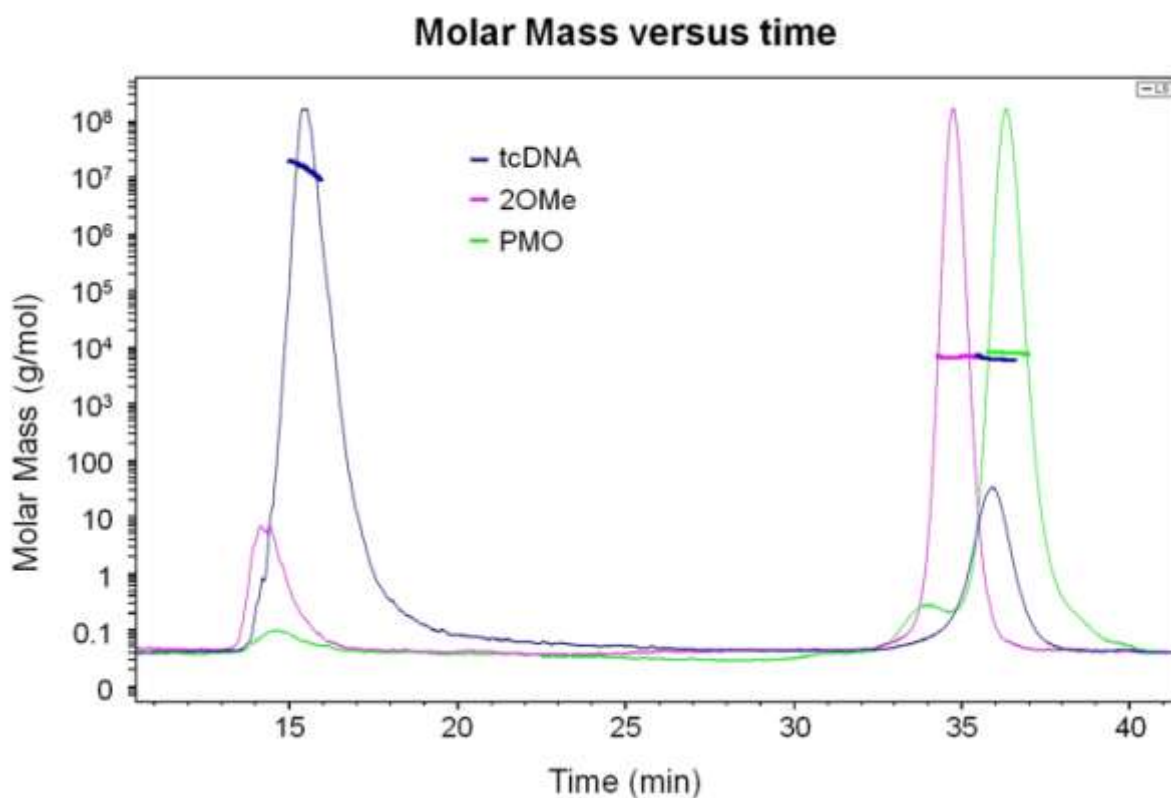
AON	Sequence	Position	Length	MW
tcDNA	5'-AACCTCGGCTTACCT-3'	+2-13	15 nt	5363
2'OMe	5'-GGCCAAACCUCGGCUUACCU-3'	+7-13	20 nt	6887
PMO	5'-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT-3'	+7-18	25 nt	8413

Supplementary Table 1 – AONs targeting the mouse exon 23 donor splice site of the dystrophin gene. To ensure optimal efficiency for each chemistry, taking into account their affinity with the target and previous studies¹⁵⁻¹⁶, we used 3 overlapping AONs of different lengths (M23D: tcDNA (+2-13) 15-mer; 2'OMe (+2-18) 20-mer; PMO (+7-18) 25-mer). TcDNA were compared to the best published 2'OMe and PMO AONs sequences published and previously used in comparison studies¹⁷.

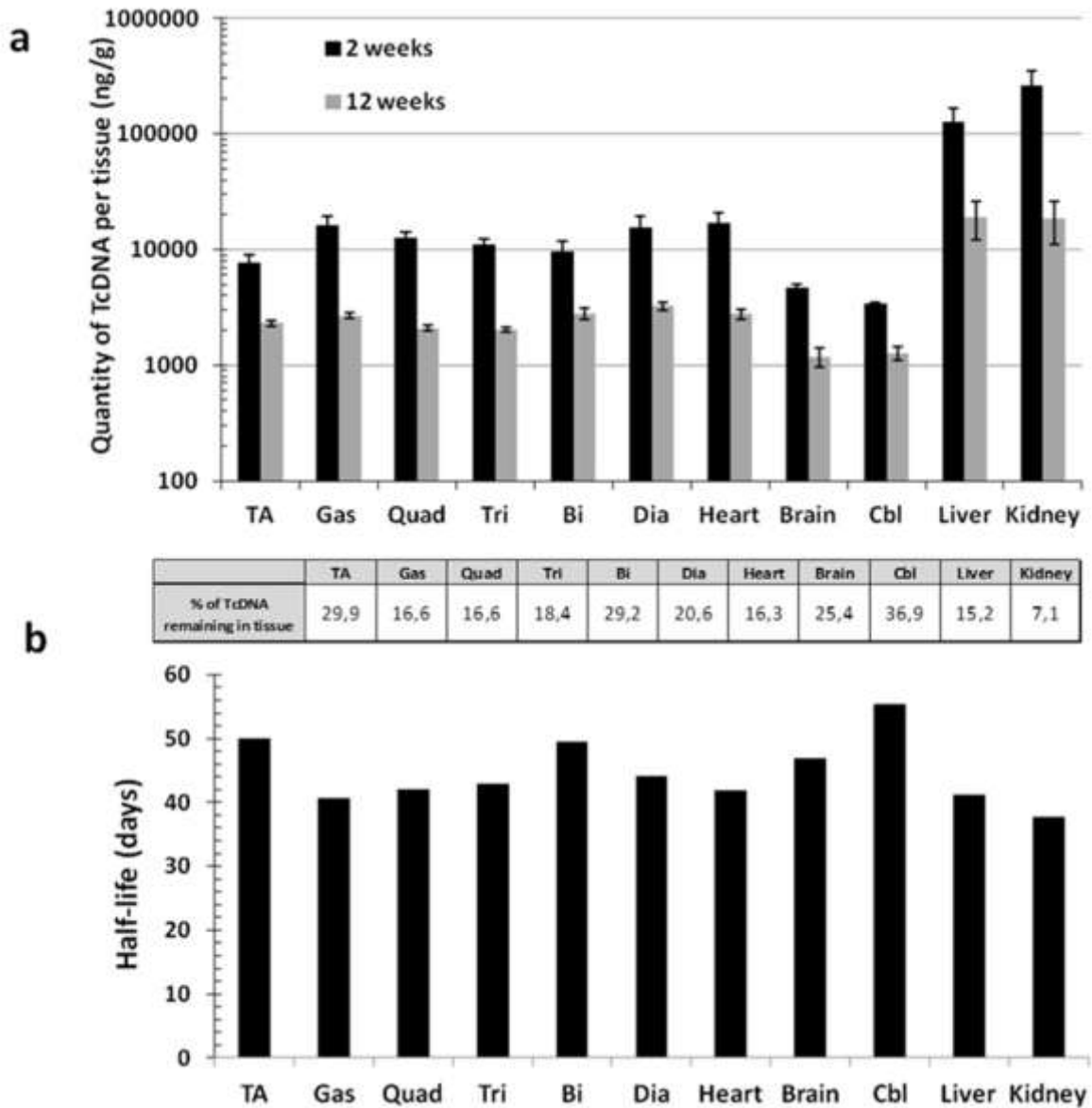
Supplementary figures



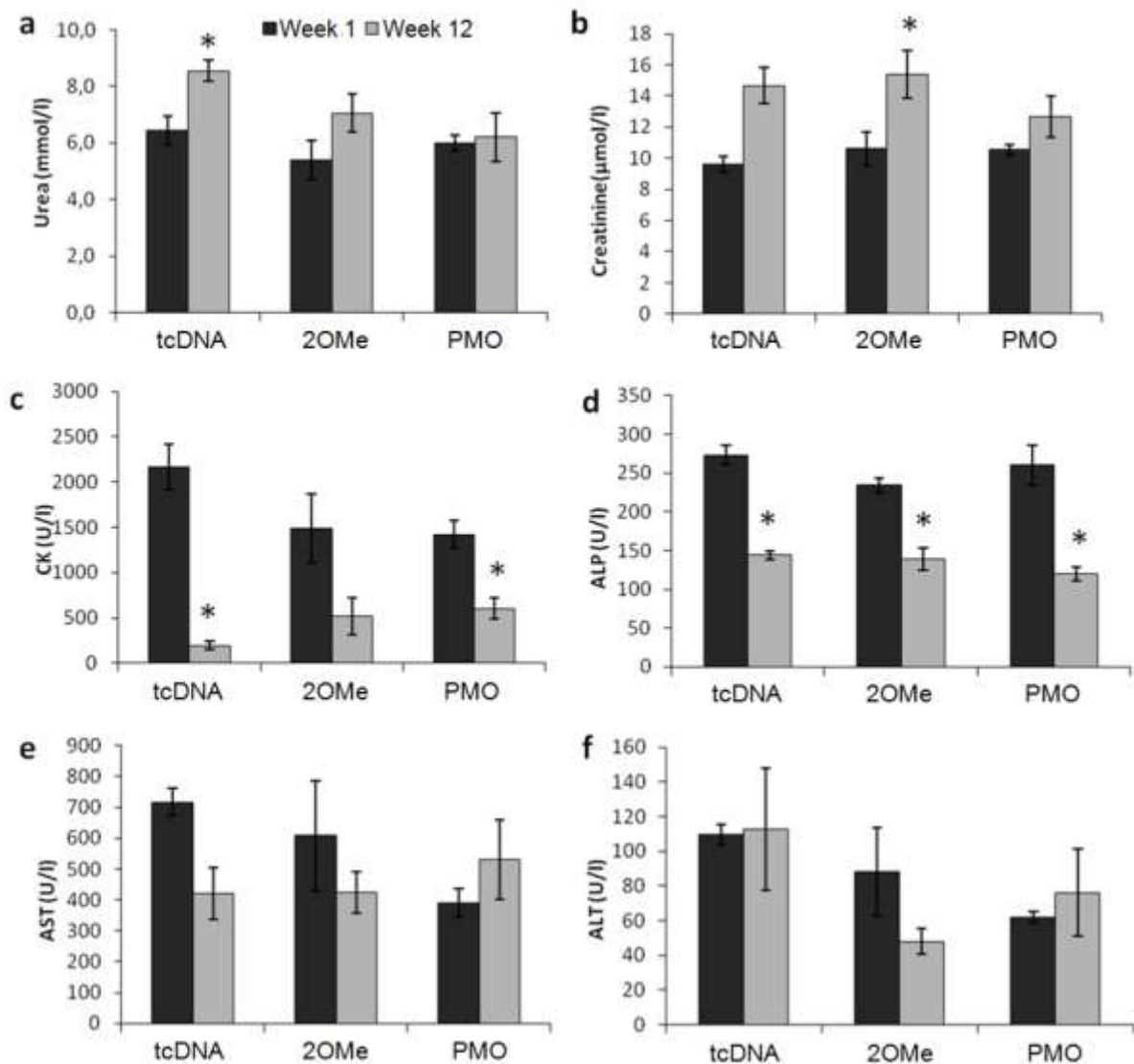
Supplementary Figure 1 - Representation of the chemical structure of tcDNA as compared with DNA.



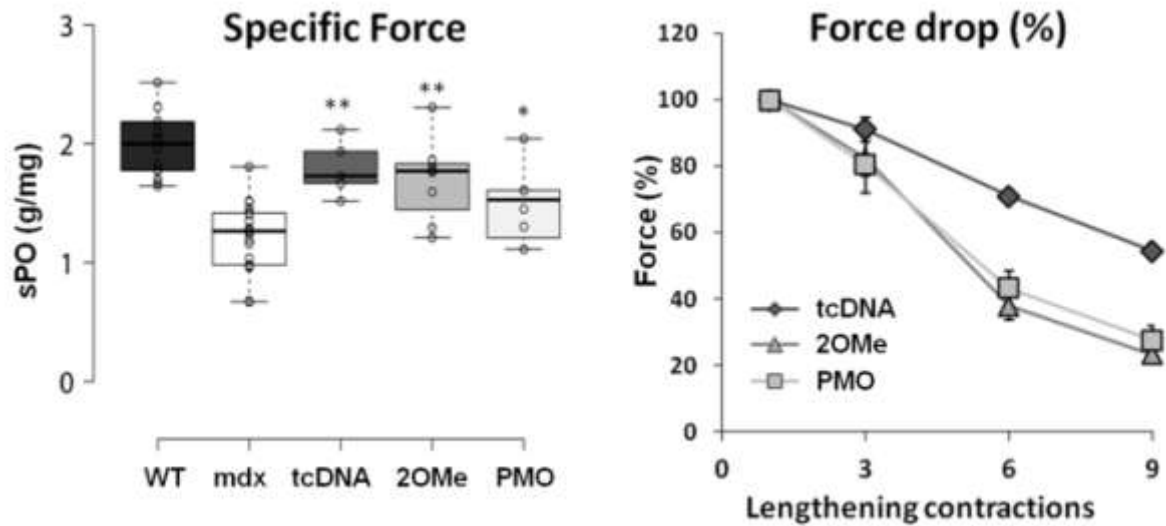
Supplementary Figure 2. Size-Exclusion Chromatography with Multi-Angle Static Light Scattering (SEC-MALS). Representative SEC-MALS analyses of tcDNA, 2OMe and PMO. Analysis the different oligonucleotides at a concentration of 100 μ M in PBS by size exclusion chromatography followed by in-line multi-angle light scattering. The right axis represents the molecular mass at any given point in the elution profile. The elution profiles are shown and demonstrate a significantly detectable particulate fraction only in the tcDNA sample with a molecular mass of 1.58×10^7 Da. Fainter particulate signals can be seen for 2OMe and PMO samples; however, molecular masses cannot be determined for these signals as they are below the instrument detection limit.



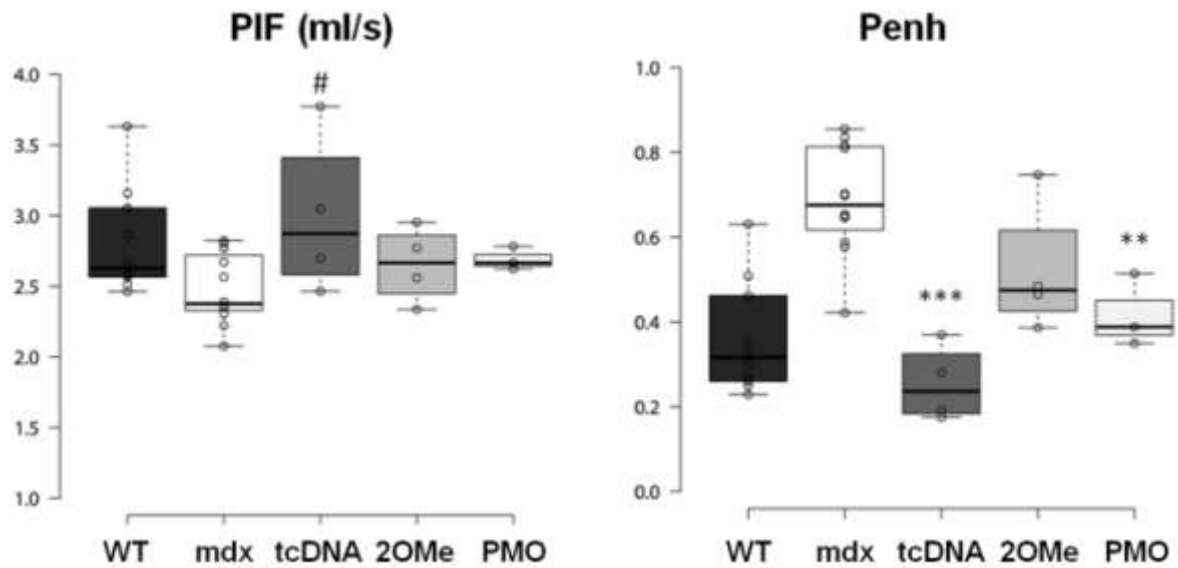
Supplementary Figure 3. TcDNA AON detection over time. (a) Pharmacokinetic of tcDNA in *mdx* mice after intravenous injection of 200 mg/kg/wk of tcDNA for 4 weeks. Tissue were analysed for tcDNA content by HPLC-MS/MS 2 weeks or 12 weeks after the end of the treatment. The table below displays the percentage of tcDNA remaining in the tissue 12 weeks after the treatment compared to the levels detected 2 weeks after the end of the treatment. (b) The half-life of tcDNA in tissue was calculated from the tissue content measured by HPLC-MS/MS 2 weeks or 12 weeks after the end of the treatment and expressed in days.



Supplementary Figure 4. Serum biomarkers levels in *mdx* treated mice. Serum levels of urea (a), creatinine (b), creatine kinase (CK) (c), alkaline phosphatase (ALP) (d), Aspartate aminotransferase (AST) (e) and Alanine aminotransferase (ALT) (f) were measured before and at the end of the treatment in mice treated with 200mg/kg/wk of tcDNA, 2'OMe or PMO for 12 weeks. Serum CK levels are reduced in mice treated with all AONs at high dose, correlating the levels of dystrophin restoration. N=4 per group; error bars are \pm SEM; * $p < 0.05$ (t test for heteroscedastic variables).

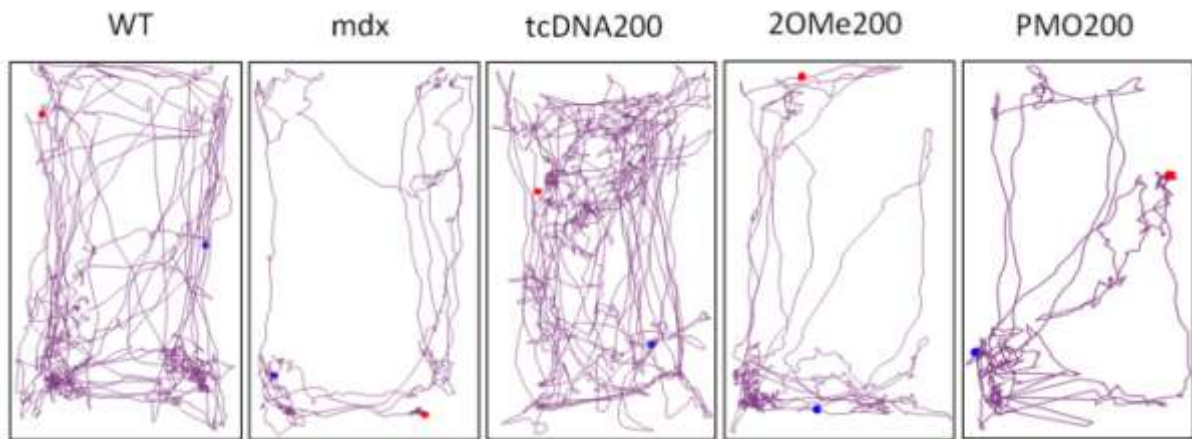


Supplementary Figure 5. Comparison of equimolar dose of tcDNA, 2'OMe and PMO on muscle function. *Tibialis anterior* (TA) muscles of *mdx* mice treated with an equimolar dose of 15 μ mol of tcDNA, 2'OMe or PMO were analyzed for their specific force. Specific force in tcDNA treated mice is not significantly different from wild type, ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ compared to control *mdx* mice. The percentage of force drop reveals that tcDNA treated muscles are significantly more resilient compared to 2'OMe treatment (* $p < 0.05$) (Mann-Whitney U tests). N=4 per group; error bars \pm SEM.

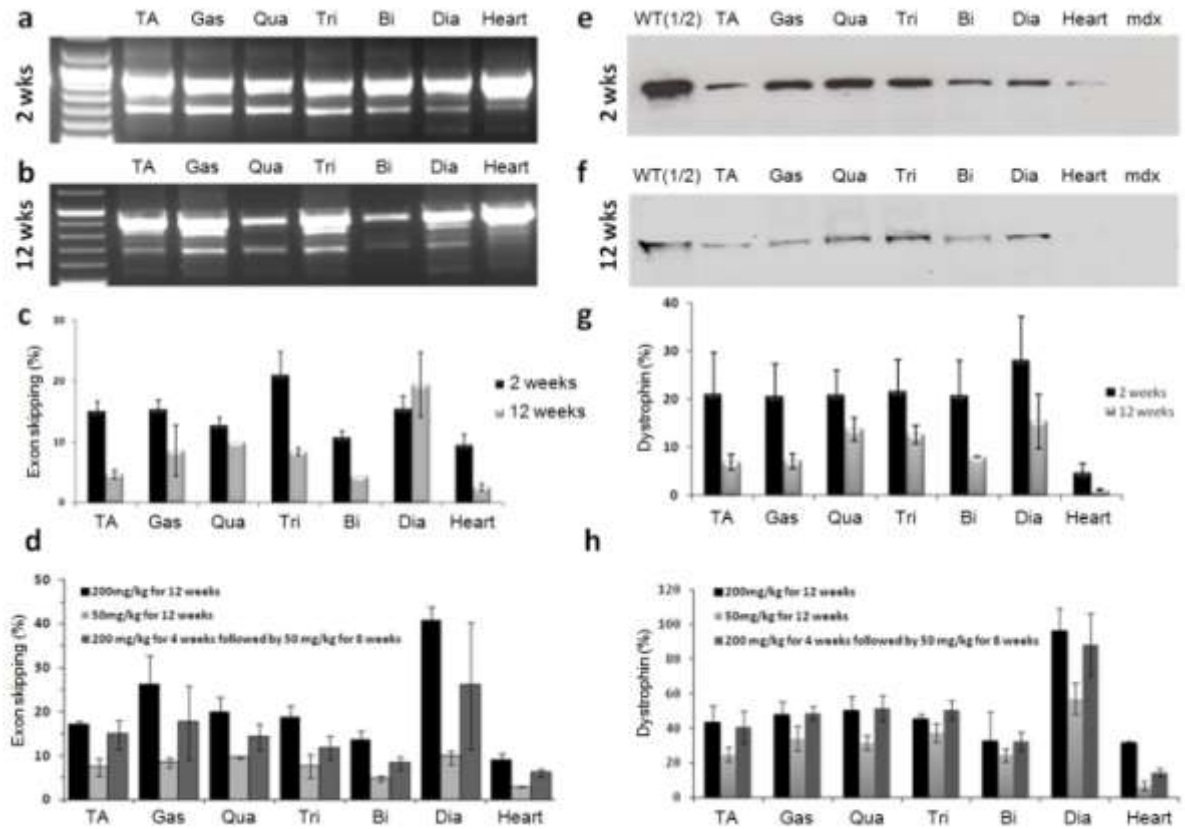


Supplementary Figure 6. Additional parameters of respiratory function: PIF and penh.

Respiratory function was measured by whole body plethysmography in *mdx* mice treated with 200 mg/kg of tcDNA, 2'OMe or PMO for 12 weeks (N=4 per group except for PMO N=3), compared to *mdx* control (N=12) and wild-type (WT) mice (N=10). Peak inspiratory flow (PIF) and enhanced pause (penh= (PEF/PIF) x Pause; Pause = (Te/RT)-1 and Te, Expiratory time; RT, time to expire 65% of the volume) are shown. Error bars are \pm SEM; ***p< 0.001, **p<0.01 and #p=0.052 compared to *mdx* control mice (Mann-Whitney U tests). Data are shown as box plots, center lines show the medians, box limits indicate the 25th and 75th percentiles, whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles and individual data points are plotted as open circles.



Supplementary Figure 7. Stress-induced unconditioned fear. Sample individual track plots showing the distance run by mice during the 5 min testing period. Sample traces were selected to represent the average score recorded in WT and *mdx* control groups, and in the groups of *mdx* mice injected with 200 mg/kg tcDNA (tcDNA-200), 2'OMe (2'OMe-200) and PMO (PMO-200). The blue and red dots indicate the start and end of the tracking record, respectively.



Supplementary Figure 8. Lasting effect of tcDNA treatment. The durability of the treatment was assessed by comparing treated mice 2 weeks or 12 weeks after the end of a 4-week tcDNA treatment at 200 mg/kg/wk. **(a-b)** Detection of exon 23-skipped dystrophin mRNA in *mdx* muscles including *tibialis anterior* (TA), *gastrocnemius* (Gas), *quadriceps femoris* (Quad), *triceps brachialis* (Tri), *biceps brachialis* (Bi), diaphragm (Dia) and heart 2 weeks (a) or 12 weeks (b) after the final injection. **(c)** Exon 23 skipping was quantified by Taqman qPCR and expressed as a percentage of total dystrophin mRNA, measured by the exon 4-5 expression level, after normalization with an endogenous control. N=4 mice per group; error bars are mean \pm SEM. **(e-f)** Western blot of total protein extracted from different muscles from treated mice 2 weeks (e) or 12 weeks (f) after the final injection, stained with the NCL-DYS1. 100 μ g of total protein were loaded for treated samples and 50 μ g for the WT control. **(g)** Levels of restored dystrophin are quantified in various muscles, membranes were converted to numerical pictures by scanning, and band intensities were analyzed using the ImageJ 1.46r software. Dystrophin levels are expressed as percentage of WT levels. This suggests that tcDNA are stable in cells and could be re-employed over time thus limiting the need to fill up tissues

as often as it would be required if these oligos were destroyed or tittered by their mRNA target. **(d-h)** Another way to test durability of the treatment. Three sets of animals were treated with different tcDNA dosing regimen. Set 1 for 12 weeks at 200 mg/kg/week, Set 2 for 12 weeks at 50 mg/kg/week and Set 3 for 4 weeks at 200 mg/kg/week followed by 8 weeks at 50 mg/kg/week. Muscles were collected 2 weeks after the final injection and analyzed by Taqman RT-qPCR **(d)** and by Western blot **(h)**. Levels of exon skipping and dystrophin restoration obtained with the set 3 (for 4 weeks at 200mg/kg/week followed by 8 weeks at 50 mg/kg/week) are not significantly different from mice treated at 200mg/mg/kg over 12 weeks. Error bars are shown as \pm SEM (N=3 per group).

Supplementary Video 1- Control dKO mouse. Representative decreased ambulation of a 8-week old control dKO mouse. The reduced musculature considerably affects the mobility of the mice, which display a very severe dystrophic phenotype, including contracted and stiff limbs, and very pronounced kyphosis as a result of the degenerative process.

Supplementary Video 2– TcDNA treated dKO mouse. The dystrophic pathology of the treated mouse appears greatly improved as the animal demonstrates only a minimal kyphosis and is very mobile compared to the untreated control.

Discussion

Les altérations associées à la dystrophie musculaire de Duchenne sont vastes et hétérogènes. Les patients présentent des troubles sensoriels, cognitifs, exécutifs et neuropsychiatriques, en fonction des formes cérébrales de dystrophines touchées. Dans ce travail de thèse, nous avons utilisés deux modèles murins, ayant perdu soit la forme complète et neuronale de dystrophine (Dp427, souris *mdx*), soit la Dp71 à expression majoritairement gliale (souris Dp71-null), afin de préciser les relations génotypes-phénotypes associées à cette pathologie.

Dans un premier article, nous avons montré que la souris *mdx* ne présente pas d'altérations de la perception et du filtrage sensoriel des informations auditives, mais qu'elle présente de forts déficits d'acquisition et de rétention à long terme d'un conditionnement de peur, suggérant une dysfonction de l'amygdale. De plus, les légers déficits en navigation spatiale confirment que l'hippocampe est aussi affecté. Par contre, aucune altération de la flexibilité comportementale et de la mémoire de travail n'a pu être détectée chez cette souris. Dans un second article, nous avons précisé l'impact de la perte de la Dp427 dans les réponses émotionnelles, mettant en évidence une augmentation de la peur inconditionnée et de l'anxiété. Ces réponses de peur peuvent induire une inhibition durable de la fonction motrice chez la souris *mdx*, suggérant que certaines altérations centrales peuvent avoir un impact sur l'activité motrice de ces animaux. Nous avons également apporté, grâce à une étude pharmacologique, des éléments appuyant l'hypothèse selon laquelle certaines altérations comportementales pourraient reposer sur une mauvaise localisation des récepteurs GABA_A et sur une altération de l'inhibition GABAergique tonique qui est principalement sous le contrôle des récepteurs extrasynaptiques.

Dans notre troisième article, focalisé sur le rôle de la Dp71, nous avons montré que la perte de cette forme courte de dystrophine entraîne des déficits d'apprentissage spatial et de flexibilité comportementale associés à une altération marquée des processus de mémoire de travail spatiale chez la souris Dp71-null. Ces phénotypes reposent majoritairement sur un circuit incluant l'hippocampe et le cortex préfrontal. Effectivement, nous montrons une altération de la fonction synaptique corticale, caractérisée par la désorganisation des protéines synaptiques β -dystroglycane et PSD95, une augmentation de la transmission dépendante des récepteurs AMPA, une augmentation de la part excitatrice de la balance excitation/inhibition, et une réduction de la plasticité synaptique.

Dans le quatrième et dernier article, nous montrons qu'une nouvelle génération d'oligonucléotide antisens formé d'ADN tri-cyclique (tcDNA) possède des propriétés pharmacologiques nouvelles offrant une absorption beaucoup plus forte par les tissus lors d'administration systémique, capable de restaurer la fonction cardiaque et respiratoire, ainsi que le phénotype de peur inconditionné chez la souris *mdx*.

Nos résultats ont donc permis de préciser les relations génotypes-phénotypes associées à la myopathie de Duchenne. En effet, si depuis trois décennies les études cliniques tentent de relier le profil de mutation des patients à leur phénotype, la tâche reste difficile et limitée. Certaines mutations, comme celles qui touchent la Dp71, concernent un sous-groupe de patients souvent peu représenté dans les cohortes faisant l'objet d'études

neuropsychologiques détaillées, ce qui réduit la capacité d'évaluer et quantifier avec précision leur profil cognitif. De plus, la condition d'handicap des patients, leur fond génétique et leur environnement socio-économique introduisent sans doute une variabilité supplémentaire dans les relations pouvant exister entre mutation et altérations observées. De même, la littérature clinique n'arrive pas à trancher sur les bases des déficits émotionnels. Certains auteurs trouvent que les patients ne présentent pas plus de symptômes de dépression que dans la population saine, alors que d'autres auteurs alertent sur sa prévalence accrue. Ici, la part environnementale (*soutien* de la famille, des proches, du personnel de soin) joue sans doute un rôle crucial dans le processus de *résilience*, susceptibles de compenser les altérations émotionnelles, si elles étaient effectivement associées à la perte de dystrophine.

Au-delà des précisions apportées par les modèles murins, la mise en lumière de ces nouveaux phénotypes cognitifs chez la souris *mdx*, principalement ses réponses émotionnelles altérées, et chez la souris Dp71-null, qui présentent des troubles des fonctions exécutives, apportent de nouveaux marqueurs pour valider l'efficacité des thérapies ciblant le cerveau dans les études précliniques.

I. La dystrophine Dp427

La souris *mdx* bien que ne présentant que peu de symptômes musculaires avant l'âge de 15 mois (Pastoret et Sebillé, 1995), montre des altérations de la coordination motrice dans le test du rotarod, dépendant du cervelet (Grady *et al.* 2006). L'hypothèse que leurs pauvres performances dans ce test soient simplement liées à une faiblesse musculaire n'a pas été tranchée, et l'influence de fonctions centrales sur le handicap moteur reste à démontrer. Au début de cette thèse, les recherches sur les capacités cognitives de ces souris mettaient en évidence principalement des déficits de mémoire à long terme et de consolidation (Vaillend *et al.*, 1995 ; 2004) supposées dépendre essentiellement de l'hippocampe. Des éléments sur une dysfonction de l'amygdale avaient été évoqués, mais la littérature restait contradictoire (Sekiguchi *et al.*, 2009 ; Perronnet *et al.*, 2012). La souris *mdx* n'est pas réellement un modèle adapté à l'étude de la myopathie vu les phénomènes de compensation musculaire qu'elle développe (cycles de régénération), mais son phénotype cognitif, aujourd'hui considéré comme proche de celui observé chez l'Humain, permet grâce à elle, de mieux comprendre l'impact de la perte de la Dp427 sur le fonctionnement cérébral. Mais, il ne faut pas oublier qu'il y a quelques années, le phénotype cognitif de la souris *mdx* semblait alors bien éloigné de celui des patients DMD, chez qui on rapportait surtout un retard d'apprentissage de la lecture, des altérations de mémoire de travail verbale, d'attention et de mémorisation immédiate (Hinton *et al.*, 2000) et des troubles du comportement social (Hinton *et al.*, 2006, 2007), qui ont récemment aussi été mis en évidence chez la souris *mdx* (Miranda *et al.*, 2015). Cette fracture entre études cliniques et études sur les modèles animaux s'est petit à petit résorbée, avec la mise en évidence que la réduction de l'empan mnésique chez les patients pourrait impacter la mémoire à long terme (Hinton *et al.*, 2007), tandis que d'autres études suggéraient aussi une altération du cervelet chez les patients (Cyrulnik et Hinton 2008). Mais c'est surtout les

travaux de Lorusso *et al.* (2013) qui ont pour la première fois mis en avant la présence d'un déficit de mémoire à long terme dépendant de l'hippocampe chez les patients, peut-être en partie à l'origine du retard de lecture, ouvrant finalement une ligne de convergence entre études cliniques et études des modèles murins de la DMD.

Dans ce travail de thèse, nous apportons encore plus de preuves de cette convergence entre le phénotype cognitif des patients et celui de la souris *mdx*. Si le résultat majeur de notre étude, une altération des réponses émotionnelles liée à la perte de la Dp427, est en accord avec les études récentes chez les patients qui montrent des problèmes émotionnels (Ricotti *et al.*, 2016), nous mettons aussi en évidence un retard d'acquisition dans une tâche de peur conditionnée, ce qui est également important car cela montre que les déficits ne concernent pas uniquement les processus de consolidation mais aussi l'acquisition de certains apprentissages associatifs.

Les structures majeures sur lesquelles reposent ces déficits d'acquisition et de rétention, dans les tests de peur conditionnée sont les noyaux amygdaliens, le thalamus et le cortex auditif. La substance grise périaqueducale et le striatum (caudé putamen et noyau accumbens) joueraient aussi un rôle, mais plus au niveau de l'évaluation du risque (Herry et Johansen, 2014) et l'absence d'expression de dystrophine dans ces structures (Lidov *et al.*, 1993 ; Knuesel *et al.*, 1999) n'en fait pas des bonnes candidates quant à l'altération des réponses de peur. Il faut également souligner que d'autres structures pourraient être impliquées, comme l'hippocampe, le cervelet et des aires corticales (LeDoux, 2000 ; Esclassan *et al.*, 2009 ; Esclassan *et al.*, 2009). En effet, les réponses de peur inconditionnée exacerbées observées chez la souris *mdx*, longtemps vu comme un phénotype inné, pourrait aussi être la résultante d'un processus cognitif (Rosen, 2004) impliquant l'évaluation de la valence émotionnelle, l'attention et les prédictions du résultat attendu en fonction de la réponse comportementale choisie et impliquerait donc un vaste réseau de structures cérébrales.

Cependant, s'il n'y a aucun doute sur la présence d'altérations de la mémoire et des réponses émotionnelles chez la souris *mdx*, il reste parfois difficile de dissocier la cognition et la motricité de l'animal, qui bien souvent participe à la performance dans nos tests. Nous avons démontré que la locomotion de la souris *mdx* peut-être normale, mais que si l'animal est préalablement stressé suite à une contention, ses réponses de peur inconditionnée ont un effet d'inhibition durable sur la locomotion, mais pas sur sa force musculaire ni sa coordination motrice (Vaillend et Chaussenot, 2017). Chez la souris au moins, les performances motrices sont donc en partie dépendantes de fonctions centrales.

Actuellement, l'existence de ces altérations sont supposées être une conséquence de la dysfonction GABAergique (Makkar *et al.*, 2010), qui a d'ailleurs été récemment mise en évidence aussi chez les patients DMD (Suzuki *et al.*, 2016). De nombreuses études montrent une altération de la plasticité synaptique dans l'hippocampe (Vaillend *et al.*, 1999 ; Vaillend et Billard, 2002 ; Vaillend *et al.*, 2004), dans le cervelet (Kueh *et al.*, 2011) ou encore dans l'amygdale (Sekiguchi *et al.*, 2009). Une étude a également montré une désorganisation des réseaux d'interneurones corticaux chez la *mdx* (Sbriccoli *et al.*, 1995). Dans cette thèse, nous avons mis en évidence que le comportement de la souris *mdx* est plus sensible au gaboxadol, un agoniste partiel des récepteurs du GABA ciblant

spécifiquement la sous-unité δ extrasynaptique apportant de nouveaux éléments à cette hypothèse. Ce nouveau résultat permet d'envisager que des thérapies ciblant la fonction GABAergique pourraient compenser certains déficits phénotypiques et pourrait être une alternative raisonnable à la thérapie génique dans le cas de mutations touchant la Dp427.

II. La dystrophine Dp71

Dès 1989, Lindlöf *et al.* remarquent un lien entre la position de la mutation dans le gène *dmd* et la déficience intellectuelle. Trente ans plus tard, nous savons maintenant que la perte de la Dp71, lors d'une mutation en aval de l'intron 62, conduit systématiquement à une déficience intellectuelle (de Brouwer *et al.*, 2014 ; Cotton *et al.*, 2005). Au delà de la réduction du QI dans ce sous-groupe de patients, la perte de la Dp71 est également associée à une collection d'altérations incluant des troubles de la mémoire verbale à court et long terme, de la mémoire visuelle, de l'organisation visuospatiale et de la mémoire de travail. De plus, les patients ayant perdu la Dp71 présenteraient une incidence plus forte de troubles neuropsychiatriques tels que l'autisme (Wu *et al.*, 2005), l'ADHD (Pane *et al.*, 2012 ; voir Autres troubles comportementaux, page 39), l'hyperactivité et les troubles émotionnels (Ricotti *et al.*, 2016). Cependant, les mutations en aval de l'intron 62 affectent en fait l'expression de toutes les dystrophines et le phénotype reflète sans doute un effet cumulatif. La nature exacte des dysfonctions cognitives dues spécifiquement à la perte de Dp71 sont donc toujours inconnues.

Au commencement de cette thèse, la souris Dp71-null était un modèle récent dont le phénotype était encore largement inconnu. Daoud *et al.* (2009) ont été les premiers à effectuer une caractérisation comportementale partielle et à relever des déficits spécifiques dans le comportement exploratoire, la rétention d'une tâche d'évitement passif, mais surtout un important déficit d'apprentissage et de mémoire spatiale.

Dans notre travail, nous avons été plus loin, en montrant une altération de la flexibilité comportementale dans deux apprentissages spatiaux (en piscine de Morris et en labyrinthe radial) et un retard d'apprentissage dans le test de la piscine de Morris. Mais le résultat le plus important est son déficit clair et robuste de mémoire de travail dans le test du DNMTTP. Modéliser les capacités intellectuelles chez la souris est une tâche très délicate, cependant des études récentes tendent à montrer que chez le rongeur, il y a un lien causal entre les capacités de mémoire de travail et les aptitudes cognitives globales pouvant être mises en parallèle avec la mesure globale du QI chez l'Homme (Matzel et Kolata, 2010). De fait, la mémoire de travail serait une modalité importante à étudier quand on s'intéresse à la notion d'intelligence chez la souris. Ceci semblerait donc confirmer que le modèle Dp71-null serait adapté pour l'étude de la déficience intellectuelle observée chez les patients DMD.

Les altérations comportementales observées chez les patients et la souris Dp71-null (mémoire, fonctions exécutives) peuvent impliquer un circuit impliquant l'hippocampe et le cortex préfrontal (D'Angelo *et al.*, 2011 ; Ricotti *et al.*, 2016). Cependant, notre étude n'a apporté aucune précision sur le rôle du cervelet, qui pourrait également être impliqué chez les patients, comme le soulignent Cyrulnik et Hinton (2008). En effet, cette structure joue

un rôle dans la mémoire de travail verbale (Desmond *et al.*, 1997) qui est affectée chez les patients ayant perdus la Dp71 (Ricotti *et al.*, 2016), ainsi que dans le langage et la lecture (De Smet *et al.*, 2013), également affectés chez les patients (Billard *et al.*, 1998). La question est d'autant plus importante que l'on observe des déficits de rappel différé en labyrinthe en T (Daoud *et al.*, 2009), de flexibilité comportementale et de mémoire de travail chez la souris Dp71-null, tâches qui peuvent aussi être altérées dans certains modèles murins avec des altérations cérébelleuses (Petrosini *et al.*, 1996 ; Leggio *et al.*, 1999 ; Caston *et al.*, 2004 ; Dickson *et al.*, 2010). Les altérations émotionnelles chez ce modèle restent à clarifier, afin de déterminer si la perte de Dp71 serait également un facteur aggravant des troubles émotionnels et/ou des troubles du comportement social.

Au-delà des phénotypes et des structures impliquées, se pose la question des mécanismes moléculaires mis en jeu. Chez la souris Dp71-null, c'est principalement la neurotransmission glutamatergique qui est mise en cause, avec une réduction de la plasticité synaptique et une balance excitation/inhibition déséquilibrée au profit de l'excitation. Cependant, on ignore encore les causes précises de cette altération. Daoud *et al.* (2009) soulève l'hypothèse d'un rôle synaptique de la Dp71, tandis qu'actuellement dans notre équipe, nous nous focalisons sur le rôle glial de cette protéine qui est présente dans les astrocytes périvasculaires en interactions avec les canaux aqueux AQP4 et avec les canaux potassiques Kir4.1. En l'absence de Dp71, une délocalisation des canaux AQP4 entraînerait des altérations de la barrière hémato-encéphalique, tandis que celle des canaux potassiques entraînerait des problèmes d'homéostasie avec une augmentation de potassium extracellulaire pouvant influencer sur l'excitabilité neuronale. La balance excitation/inhibition corticale a fait l'objet de nombreuses études depuis la découverte de son implication dans les processus de mémoire de travail, l'autisme et la schizophrénie, et une détérioration de ce processus homéostatique pourrait être à la base des déficits centraux résultant de la perte de Dp71.

III. Perspectives thérapeutiques

Au moment de la rédaction de ces travaux de thèse, *il n'existe toujours aucun traitement curatif pour la dystrophie musculaire de Duchenne*. Cependant, les approches thérapeutiques sont nombreuses, utilisant des méthodes diverses ciblant différentes modalités de la pathologie.

Une des composantes les plus handicapantes de la maladie reste la myopathie, qui va non seulement rendre dépendants très jeunes les patients, mais est également responsable de l'issue fatale par atteinte des muscles cardiaques et respiratoires (Eagle *et al.*, 2002 ; Van Ruiten *et al.*, 2016). La dystrophine complète ou Dp427 est une molécule très grande, rendant impossibles les approches d'apport de gène par vecteur viral. Des approches pharmacologiques tentant de sur-exprimer l'utrophine, un homologue de la dystrophine, se sont révélées inefficaces (Perronnet *et al.*, 2012). Bien que les deux protéines partagent une grande homologie de séquence, leur localisation cellulaire n'est pas identique et ne permet pas de compenser l'absence de dystrophine. Depuis quelques années, le système CRISPR/Cas9 a énormément fait parlé de lui, tout autant pour les avancées dans l'édition

de l'ADN qu'il apporte, que ses implications éthiques concernant l'édition du code génétique. Quelques études ont déjà utilisé ce système dans le cadre de la myopathie de Duchenne, particulièrement chez la souris *mdx*. Les résultats sont encourageants (Xu *et al.*, 2016 ; Bengtsson *et al.*, 2017), mais CRISPR/Cas9 reste une approche très récente nécessitant encore de nombreux travaux avant d'envisager des études pré-cliniques. Une perspective plus réaliste à plus court terme est la technique de saut d'exon (*exon skipping*) qui permet de cibler spécifiquement la mutation et d'épisser la partie du gène qui contient la mutation. Elle est cependant inadaptée dans le cas de délétion étendue du gène qui nécessiterait de supprimer une grande partie des domaines fonctionnels de la protéine. Cette technique a été initialement validée chez la souris *mdx* en utilisant un vecteur viral (rAAV2/1) codant pour des petits ARN nucléaires contenant des séquences antisens permettant de moduler l'épissage du pré-ARNm de la dystrophine (Vaillend *et al.*, 2010 ; Dallérac *et al.*, 2011), cependant la faible diffusion des vecteurs rendait impossible le traitement complet du cerveau et encore moins de l'ensemble des organes affectés par la maladie. Dans cette thèse, nous présentons une autre approche de saut d'exon, utilisant non pas des vecteurs viraux, mais des oligonucléotides à base d'ADN tri-cyclique (tcDNA), qui non seulement n'induisent pas de réaction immunitaire (permettant de renouveler le traitement) et permettent une diffusion plus large. Actuellement, nous avons démontré la capacité du tcDNA à normaliser les réponses de peur inconditionnée chez la souris *mdx* suite à des injections systémiques, dont c'est le phénotype le plus robuste, autorisant quelques espoirs sur la restauration des autres phénotypes cognitifs que nous avons mis en évidence. Les études toxicologiques sont toujours en cours, de même que la validation de l'effet du tcDNA sur les capacités cognitives des souris *mdx* (conditionnement de peur, mémoire à long terme). Contrairement aux vecteurs viraux, le tcDNA est éliminé par l'organisme au bout de quelques mois, rendant le traitement certes supposé curatif, mais à vie.

Au-delà de la dystrophine complète, la dystrophine courte Dp71 fait également l'objet de nombreuses études, tant son rôle est essentiel au niveau cérébral. Sa faible taille comparée à la Dp427 rend possible les techniques thérapeutiques se basant sur l'apport de sa séquence codante par un vecteur viral. La majorité des études ont pour l'instant porté sur la rétine, vu la forte expression de la Dp71 dans les cellules gliales de Müller qui participent à la fonction de la barrière rétinienne. Vacca *et al.* (2014 ; 2016) ont montré que la réexpression de la Dp71, en utilisant un vecteur AAV, permet de restaurer la fonction de la barrière rétinienne. En plus de la preuve qu'apporte l'étude concernant la faisabilité technique d'une telle réexpression, cela montre que la réexpression de dystrophine dans un organisme adulte permet de restaurer la fonction de la protéine et de corriger les altérations qu'elle entraîne, bien qu'elles soient congénitales. Cela offre donc également, et surtout, un espoir de traitement pour les patients adultes.

Cependant, l'espoir le plus réaliste de thérapie ne repose pas sur une technique précise, mais plus probablement, sur un ensemble de thérapies aux cibles distinctes mais complémentaires. Si actuellement le traitement à base de glucocorticoïdes (Rutter *et al.*, 2012) est le traitement phare, permettant de préserver les fonctions cardiaque et

pulmonaires durant l'adolescence, retardant d'autant l'apparition de scoliose sévère, son impact sur le comportement, particulièrement émotionnel, est actuellement la première cause d'abandon de ce traitement par les parents des enfants DMD (Dubowitz, 2013 ; Ricotti *et al.*, 2013 ; Zatz et Pavanello, 2013). Le rôle des stéroïdes dans la cognition est encore mal connu, et pourrait d'ailleurs être responsable de certains troubles observés chez les patients. En revanche, cela ne signifie pas nécessairement que toute approche pharmacologique est inadéquate. Comme nous l'avons mis en évidence au cours de nos travaux, la Dp427 joue un rôle essentiel dans le système GABAergique, particulièrement concernant l'adressage des récepteurs extrasynaptiques (Vaillend et Chausseot, 2017) et cela pourrait avoir un lien significatif avec le phénotype émotionnel et cognitif des patients. Une approche visant à compenser ces altérations GABAergiques pourrait donc être une piste thérapeutique. A l'inverse, chez les patients ayant perdu la Dp71, la cible serait plus probablement le système glutamatergique, dans le but de normaliser la balance excitation/inhibition. Cette balance, impliquée dans les fonctions exécutives (Ribeiro *et al.*, 2015) et l'autisme (Lee *et al.*, 2016), deux phénotypes altérés chez les patients, pourrait donc être une cible thérapeutique intéressante. Nos travaux ont apporté de nombreuses précisions sur le phénotype de la souris *mdx*, uniquement déficiente en Dp427, et sur celui de la souris Dp71-null, uniquement déficiente en Dp71, mais il reste une question en suspens : *quel est le phénotype lorsque que toutes les dystrophines sont absentes ?* A l'heure actuelle, les études sur la *mdx*^{3cv}, déficiente pour toutes les dystrophines, sont incomplètes et ce modèle murin est imparfait (expression résiduelle des dystrophines malgré la mutation), et nous ignorons toujours l'impact précis de la perte cumulée des dystrophines sur le système GABAergique et glutamatergique. De plus, certaines mutations altérant l'expression de toutes les dystrophines sauf la Dp71 sont aussi associées à une déficience intellectuelle, suggérant aussi un rôle majeur de la Dp140 dans l'atteinte centrale dans la DMD. Le rôle de la Dp140 dans le cerveau est inconnu, et des études approfondies d'autres modèles murins de la DMD seront nécessaires pour éclaircir ce point.

Dans l'attente de thérapies curatives, il existe de nombreuses approches pour rendre la vie des patients un peu plus confortable. Nous en avons abordés deux en introduction, cette étude brésilienne (Rodrigues *et al.*, 2009) qui démontre une amélioration respiratoire par la pratique du yoga et (Bruggen *et al.*, 2015) qui utilise le chewing-gum pour retarder l'atteinte des muscles masticateurs. Cela peut sembler anecdotique au vu de la sévérité de cette pathologie, mais l'aspect émotionnel joue un rôle essentiel dans la perception du handicap par le patient et chaque petite victoire est une occasion d'espérer qu'un mieux est possible. Fee et Hinton (2011) ont d'ailleurs démontré que la nature quantifiable de l'adversité est moins importante pour l'enfant que sa résilience à sa condition. Le *soutien*, qu'il soit familial ou par l'intermédiaire du personnel de soin, peut permettre au patient de mieux vivre sa condition. Les modèles murins, que ce soit la souris *mdx* ou la souris Dp71-null peuvent jouer un rôle, en apportant des connaissances plus précises sur les fonctions altérées en fonction de la mutation, éléments qui peuvent permettre de mettre en place de nouvelles stratégies d'accompagnements à la carte en fonction des profils de mutation. Il est important de noter que dans la déficience intellectuelle, les limitations cognitives peuvent

coexister avec des forces et peuvent progresser au cours de la vie du patient. Enfin, il ne faut pas se limiter au seul patient. Bien souvent, les familles qui s'occupent d'un enfant myopathe, sont également à risque, notamment face au stress (Nereo, *et al.*, 2003 ; Yamaguchi et Suzuki, 2015) et doivent être incluses dans le soutien apporté par les personnels de soins. Il y a également un travail d'éducation à faire au niveau de la population et des institutions. Les patients DMD vivent de plus en plus vieux, parfois de façon autonome et en exerçant un métier (Eagle *et al.*, 2002). L'accessibilité des villes n'est pas toujours en adéquation avec la réalité des personnes à mobilité réduite. Une ville accessible à un handicapé fait également parti de son sentiment d'intégration et atténue ses impossibilités liées à la maladie, contribuant à sa résilience et lui permettant d'être autonome. Accessibilité contribuant également aux autres citoyens, comme les parents utilisant des poussettes, aux voyageurs qui possèdent des valises ou aux personnes âgées (Fitzgerald et Caro, 2014).

Annexes

I. Annexe 1 : Échelles de Bayley du développement de l'enfant

Les échelles de Bayley du développement de l'enfant (BSID : Bayley Scales of Infant and Toddler Development), mises au point par la psychologue américaine N. Bayley et applicables aux enfants dont l'âge est compris entre 2 mois et 2 ans et demi, évaluent le développement de certaines fonctions cognitives, motrices, socio-émotionnelles, ainsi que le langage et l'adaptabilité comportementale.

Le test dure entre 45 à 60 minutes et donne un quotient de développement (DQ : developmental quotient) compris entre 40 et 160, plutôt qu'un quotient intellectuel (voir Annexe 2, ci-dessous, sur les échelles de Wechsler).

La première édition date de 1969, la seconde de 1993 et sa troisième et dernière version (BSID-III), utilisée actuellement, date de 2006. Elle se compose de 5 parties, les trois premières testant les capacités de l'enfant et les deux suivantes étant des questionnaires :

- **Cognition** : Évalue le développement sensori-moteur, les capacités d'exploration et de manipulation, la formation de concepts, les fonctions mnésiques et la relation à l'objet. Selon l'âge de l'enfant, les items de cette échelle permettent d'évaluer par exemple les différents stades du jeu, les concepts de nombre et de comptage...

- **Langage** : Se divise en deux sous-parties : la compréhension et l'expression.

La partie de compréhension ou de réception mesure les comportements préverbaux, la compréhension verbale et le développement du vocabulaire en proposant des items d'identification d'objets ou de photos par exemple. Chez les nourrissons, lorsque le langage n'est pas encore acquis, les items des premières tranches d'âge évaluent l'acuité auditive, la capacité à répondre au son de la voix d'une personne, les capacités de discrimination et de localisation des sons. Chez les enfants plus âgés, les items sollicitent les aptitudes à comprendre et à répondre de manière appropriée aux mots et aux demandes. La difficulté des items se reflète dans le nombre de mots qui augmente progressivement et le type de mots employés.

La partie d'expression évalue les communications préverbales, (babillage, gestes, tour de parole...), le développement du vocabulaire, la capacité à nommer des objets, des photos ou attributs ainsi que le développement de la morphologie et de la syntaxe (utiliser des énoncés de deux mots, accorder les pluriels et les temps des verbes...). Chez le jeune enfant, cette partie permet de mesurer la capacité de vocalise et de babillage, l'utilisation des combinaisons consonne – voyelle et l'aptitude à imiter des mots et des sons produits par l'adulte.

- **Motricité** : Se divise en deux sous-parties : la motricité fine et la motricité globale.

La partie de motricité fine mesure l'intégration perceptivo-motrice, l'organisation motrice et la vitesse motrice ainsi que les capacités de préhension. Concernant le domaine de la préhension, les items mettent en jeu la poursuite visuelle, les gestes d'atteinte, la manipulation d'objets et les réactions en réponse aux informations tactiles.

La partie de motricité globale évalue les mouvements des membres supérieurs et inférieurs et les mouvements de l'axe. Afin de permettre une évaluation complète, les items évaluent à la fois le positionnement statique (assis, debout) et les mouvements dynamiques (coordinations et locomotion) ainsi que les capacités d'équilibre et de planification motrice.

- **Fonctions socio-émotionnelles** : Les questions posées aux soignants permettent de mesurer les compétences émotionnelles fonctionnelles et leur autorégulation, ainsi que l'intérêt porté à l'environnement, la communication des besoins et la capacité d'engager les autres et d'établir des relations en utilisant des signaux émotionnels ou des gestes adaptés.

- **Comportement** : les questions présentées aux parents abordent différents domaines tels que la communication (langage, écoute, communications non verbales), la sécurité (conscience du danger, attitude de prudence), les loisirs et activités (jeux) et l'autonomie dans les soins quotidiens (repas, toilette). Les items traitent aussi les prérequis aux apprentissages (connaissance des lettres, comptage, graphisme), les compétences sociales (relations interpersonnelles, reconnaissance des émotions et les aptitudes motrices (locomotion, manipulation).

Les études citées dans ce mémoire prenant majoritairement place entre 1990 et 2010, la BSID-III fut l'édition la plus utilisée.

II. Annexe 2 : Quotient intellectuel (Wechsler Intelligence Scale for Children)

Le quotient intellectuel global (FSIQ, l'expression « QI » étant un raccourci) est le plus souvent calculé en se basant sur l'échelle de Wechsler.

Le WISC (*Wechsler Intelligence Scale for Children*), applicable de l'âge de 7 ans et 4 mois jusqu'à 16 ans étant la plus représentée dans ce manuscrit, nous allons la détailler ci-après, mais la méthodologie générale reste similaire pour le WPPSI (*Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence*, pour les enfants d'âge préscolaire) et le WAIS (*Wechsler Adult Intelligence Scale*, pour les grands adolescents et adultes).

La première version date de 1949 et la dernière de 2014 (cinquième édition). Le WISC nécessitant un étalonnage par pays et une traduction, la version française du WISC-V n'est disponible que depuis 2016.

Le WISC est une épreuve composite, qui va évaluer les aspects suivants (pour le WISC-VI de 2003 à 2014) :

Indice de compréhension verbale: Permet de rendre compte de la capacité de l'enfant à être prêt aux enseignements scolaires. Il se compose de 5 sous-tests :

- **Similitudes** : On demande à l'enfant en quoi 23 séries de mots se ressemblent.
- **Vocabulaire** : L'enfant doit donner la définition de 36 mots.
- **Compréhension** : On s'intéresse à « l'intelligence sociale » de l'enfant (exemple : pourquoi va-t-on à l'école ?).
- **Connaissances** : Evaluation des connaissances acquises.
- **Raisonnement verbal** : Met en avant la capacité à regrouper des parties en un tout, à manipuler des concepts verbaux.

Indice de raisonnement perceptif : Evalue les compétences de conceptualisation et de raisonnement.

- **Cubes** : L'enfant doit reproduire des dessins en deux dimensions. On estime qu'un bon score à ce test permet d'exclure la déficience intellectuelle, la réciproque étant fausse.
- **Concepts en image** : L'enfant trie des images en fonction de leur point commun.
- **Matrices** : L'enfant doit sélectionner la partie manquante d'une matrice ; il s'agit d'une sorte de suite logique.
- **Images à compléter** : L'enfant observe une image et doit indiquer l'élément manquant.

Indice de mémoire de travail

- **Séquence de chiffres** : L'enfant doit répéter dans le même ordre, puis dans l'ordre inverse, une suite de chiffre.
- **Séquence lettres et chiffres** : L'enfant doit restituer une suite de lettre et chiffre.
- **Arithmétique** : Plus que les capacités en calcul mental, cette partie cherche à évaluer la compréhension de l'énoncé, la mémoire et la capacité à résoudre des problèmes.

Indice de vitesse de traitement : Jauge la capacité d'attention, la rapidité d'interprétation ainsi que les aptitudes à mettre en séquences des informations visuelles.

- **Code** : L'enfant doit reproduire des formes géométriques.
- **Repérage des symboles** : L'enfant doit vérifier la présence d'un symbole dans une série.
- **Annulation** : L'enfant doit retirer le maximum d'images d'animaux parmi d'autres images.

Les interprétations du score du quotient intellectuel complet (FSIQ) s'effectuent ainsi (d'après le DSM-IV) :

- 100 est le score moyen/normal (par convention, 50% de la population est « normale »)
- 50 à 70 : retard mental léger
- 35 à 50 : retard mental modéré
- 20 à 35 : retard mental sévère
- Inférieur à 20 : retard mental profond

De 1949 à 2003 (de la première à la troisième version), seuls les mesures composites FSIQ (full-scale IQ), VIQ (verbal IQ) et PIQ (performance IQ) sont présents. Ces mesures se calculent à partir des résultats à divers tests (similitudes, vocabulaire, compréhension). Dans sa version suivante, le WISC-IV (2003) abandonne les VIQ et PIQ au profit des quatre indices décrits plus haut. Le WISC-V (2014) encore peu utilisé, ajoute un cinquième indice et surtout rend de plus en plus obsolète le FSIQ. En effet, dans la cinquième version du *Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux* (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM), le « retard mental » n'existe plus, au profit de l'appellation « déficience intellectuelle » (DI). Cette DI ne se base plus uniquement sur le FSIQ (qui fut le critère majeur dans le DSM-IV pour le diagnostic du retard mental), mais sur toute une collection de symptômes (du domaine de la vie quotidienne, social et conceptuel).

Les études citées dans ce mémoire prenant majoritairement place entre 1980 et 2010, le WISC-III fut l'édition la plus utilisée se basant majoritairement sur les FSIQ, VIQ, et PIQ. Les études les plus récentes se basant sur le WISC-IV (mesurant notamment un indice de mémoire de travail) verront les nouveaux indices cités.

III. Annexe 3 : Du gène à la protéine

Domaine	Sous-domaine	Interaction	Exons	Acides aminés
NT		Actine	2-8	14-240
Central				
	H1		(8)-9	253-327
	1	Membrane plasmique	10-11	337-447
	2		12-14	448-556
	3		14-16	557-667
	H2		17	668-717
	4		(17)-20	718-828
	5		20-21	829-934
	6		22-23	935-1045
	7		(23)-(26)	1046-1154
	8		26-27	1155-1263
	9		28-(30)	1264-1367
	10		30-32	1368-1463
	11	Actine	32-(34)	1464-1568
	12		34-35	1569-1676
	13		36-37	1677-1778
	14		38-(40)	1779-1874
	15		40-41	1875-1973
	16	nNOS	42-43	1992-2101
	17		44-45	2102-2208
	18		46-48	2209-2318
	19		48-50	2319-2423
	H3		50-51	2424-2470
	20	Microtubules	51-53	2471-2577
	21		53-(55)	2578-2686
	22		55-(57)	2687-2802
	23		57-59	2803-2931
	24		59-(61)	2932-3040
	H4	β -dystroglycane	61-64	3041-3112
CR				
		β -dystroglycane	63-70	3080-3408
	Domaine WW		62-63	3056-3092
	Poignée EF	Ca ²⁺	65	3130-3157
	Poignée EF		65-66	3178-3206
	Domaine ZZ		68-69	3307-3354
CT		α 1/ β 1-syntrophine Dystrobrevine	70-79	3361-3685

Figure 15 – Domaines de la dystrophine

La dystrophine se compose de 4 domaines : amino-terminal (NT), central, riche en cystéine (CR) et terminal (CT). Le domaine central comprend 24 triples hélices de type spectrine (numéro de 1 à 24) et quatre domaines charnières riches en résidus proline (H1 à H4). Certains domaines sont impliqués dans des interactions spécifiques avec d'autres protéines associées aux dystrophines.

(Adapté de http://dmd.nl/DMD_home.html#protein)

Nom	Synonyme	Longueur	Acides aminés	ARNm	Localisation du promoteur
Dp427b	brain dystrophin	427 kDa	3 677	14 069 bp	5' Dp427m
Dp427m	dystrophine musculaire	427 kDa	3 685	13 993 bp	5' du gène
Dp427p	dystrophine des cellules de Purkinje	427 kDa	3 681	14 kb	3' Dp427m
Dp260		260 kDa	2 344	9 773 bp	intron 29
Dp140		140 kDa	1 225	7 410 bp	intron 44
	Dp140b		1 243	7 378 bp	
	Dp140ab		1 230	7 339 bp	
	Dp140c		1 115	7 050 bp	
	Dp140bc		1 133	7 048 bp	
Dp116	apo-dystrophin 2	116 kDa	956	5 623 bp	intron 55
Dp71	apo-dystrophin 1 Dp71d	70,4 kDa	617	4 623 bp	intron 62
Dp71a	Dp71dΔ71	68,9 kDa	604		
#	Dp71dΔ74	64,3 kDa	564		
#	Dp71dΔ71,74	62,8 kDa	551		
#	Dp71dΔ71,73-74	60,4 kDa	529		
Dp71c	Dp71dΔ71-74	58 kDa	507		
Dp71b	Dp71f	72,2 kDa	635		
Dp71ab	Dp71fΔ71	70,8 kDa	622		
#	Dp71fΔ74	66,1 kDa	582		
Dp71Δ110	Dp71fΔ71-74	59,8 kDa	525		
Dp40	apo-dystrophin 3	40 kDa	340	2,2 kb	intron 62

Figure 16 – Différents produits du gène *dmd*

Le gène *dmd* peut produire 6 formes de dystrophines (Dp427, Dp260, Dp140, Dp116, Dp71, Dp40), chacune pouvant également exister sous la forme de différents transcrits alternatifs. La présence de trois promoteurs internes donnent trois formes de Dp427 (Dp427b exprimée dans le cerveau (b : brain), Dp427m exprimée dans le muscle, Dp427p exprimée dans les cellules de Purkinje du cervelet). Les épissages alternatifs ont été principalement caractérisés pour la Dp140 et la Dp71 : les formes **a** ne possèdent pas l'exon 71, les formes **b** ne possèdent pas l'exon 78, les formes **ab** (aussi appelée forme **f**) ne possèdent pas les exons 71 et 78, les formes **c** ne possèdent pas l'exon 71 à 74, les formes **bc** ne possèdent pas les exons 71 à 74 et 78 (aussi appelée forme **Δ110**). # Nouveaux isoformes découverts par Aragón *et al.* en 2017, avec dans la colonne « synonyme », la nouvelle nomenclature qu'ils proposent.

(Adapté de <http://dmd.nl/isoforms.html> et Aragón *et al.*, 2017).

IV. Annexe 4 : La Dp427L : histoire d'une fausse détection

La Dp427L, aussi connue sous le nom de L-dystrophine, a été décrite par Nishio et al. (1994) dans les cellules lymphoblastoïdes (cellules du système immunitaire, précurseurs des lymphocytes) d'un patient dmd présentant une sévère cardiomyopathie. Son promoteur a été alors localisé dans l'exon 1 du gène dmd, tandis que l'exon 3 est épissé. L'existence de cet isoforme a ensuite été confirmée par Muntoni et al. (1995), mais ces auteurs trouvent, en revanche, que c'est l'exon 2 qui est épissé.

Peu d'études se sont ensuite intéressées à cette Dp427L, jusqu'à ce que Wheway et Roberts (2003) réévaluent l'existence du promoteur à l'aide des nouvelles séquences génomiques humaine/murine disponibles. Ils démontrent que ce promoteur se situe 4,5 Mb avant l'exon 2 du gène dmd, ce qui donnerait théoriquement un transcrit de 7 Mb nécessitant plus de 2 jours de transcription. De plus, l'activité transcriptionnelle dans les lymphocytes sanguins périphériques du promoteur de la Dp427L est très négligeable (1/1000) par comparaison à la Dp427m dans ce même tissu. La non conservation de ce promoteur, initialement découvert chez l'humain, chez d'autres espèces (comme la souris) poussent les deux auteurs à conclure que le promoteur de la Dp427L ne possède aucun rôle biologique.

L'existence de la Dp427L serait, en fait, un artefact lié à la mutation présente chez ce patient. Du fait d'une large délétion du début du gène dmd, ce serait le promoteur du gène précédent, CYBB, qui exprimerait son gène couplé à celui du gène dmd. La Dp427L n'est donc pas une dystrophine commune, mais uniquement la résultante d'une mutation bien particulière chez un patient.

Bibliographie

- Abbott D., Carpenter J. and Bushby K. (2012). Transition to adulthood for young men with Duchenne muscular dystrophy: Research from the UK. *Neuromuscular Disorders*. **22**, 445–446.
- Acosta R., Montañez C., Fuentes-Mera L., Gonzalez E., Gómez P., Quintero-Mora L., Mornet D., Alvarez-Salas L. M. and Cisneros B. (2004). Dystrophin Dp71 is required for neurite outgrowth in PC12 cells. *Experimental Cell Research*. **296**, 265–275.
- Adams M. E., Mueller H. A. and Froehner S. C. (2001). In vivo requirement of the alpha-syntrophin PDZ domain for the sarcolemmal localization of nNOS and aquaporin-4. *The Journal of Cell Biology*. **155**, 113–22.
- Albuquerque E. X., Pereira E. F. R., Alkondon M. and Rogers S. W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews*. **89**, 73–120.
- Aleman V., Osorio B., Chavez O., Rendon A., Mornet D. and Martinez D. (2001). Subcellular localization of Dp71 dystrophin isoforms in cultured hippocampal neurons and forebrain astrocytes. *Histochemistry and Cell Biology*. **115**, 243–254.
- Alessi A., Bragg A. D., Percival J. M., Yoo J., Albrecht D. E., Froehner S. C. and Adams M. E. (2006). gamma-Syntrophin scaffolding is spatially and functionally distinct from that of the alpha/beta syntrophins. *Experimental Cell Research*. **312**, 3084–3095.
- Amiry-Moghaddam M., Frydenlund D. S. and Ottersen O. P. (2004). Anchoring of aquaporin-4 in brain: Molecular mechanisms and implications for the physiology and pathophysiology of water transport. *Neuroscience*. **129**, 999–1010.
- Anastasi G., Tomasello F., Di Mauro D., Cutroneo G., Favaloro A., Conti A., Ruggeri A., Rinaldi C. and Trimarchi F. (2012). Expression of sarcoglycans in the human cerebral cortex: an immunohistochemical and molecular study. *Cells, Tissues, Organs*. **196**, 470–480.
- Anderson J. L., Head S. I. and Morley J. W. (2003). Altered inhibitory input to Purkinje cells of dystrophin-deficient mice. *Brain Research*. **982**, 280–283.
- Anderson J. L., Head S. I. and Morley J. W. (2004). Long-term depression is reduced in cerebellar Purkinje cells of dystrophin-deficient mdx mice. *Brain Research*. **1019**, 289–292.
- Anderson J. L., Morley J. W. and Head S. I. (2010). Enhanced homosynaptic LTD in cerebellar Purkinje cells of the dystrophic mdx mouse. *Muscle and Nerve*. **41**, 329–334.
- Aragón J., González-Reyes M., Romo-Yáñez J., Vacca O., Aguilar-González G., Rendón A., Vailland C. and Montañez C. (2017). Dystrophin Dp71 Isoforms Are Differentially Expressed in the Mouse Brain and Retina: Report of New Alternative Splicing and a Novel Nomenclature for Dp71 Isoforms. *Molecular Neurobiology*.
- Aragón J., Martínez-Herrera A., Bermúdez-Cruz R. M., Bazán M. L., Soid-Raggi G., Ceja V., Coy-Arechavaleta A. S., Alemán V., Depardón F. and Montañez C. (2015). EF-hand domains are involved in the differential cellular distribution of dystrophin Dp40. *Neuroscience Letters*. **600**, 115–120.
- Aragón J., Romo-Yáñez J., Martínez-Herrera A., Ceja V., Rendon A. and Montañez C. (2011). Characterization of Dp71Δ(78-79), a novel dystrophin mutant that stimulates PC12 cell differentiation. *Journal of Neurochemistry*. **119**, 697–707.
- Arahata K., Ishiura S., Ishiguro T., Tsukahara T., Suhara Y., Eguchi C., Ishihara T., Nonaka I., Ozawa E. and Sugita H. (1988). Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. *Nature*. **333**, 861–3.
- Astrea G., Pecini C., Gasperini F., Brisca G., Scutifero M., Bruno C., Santorelli F. M., Cioni G., Politano L., Chilosi A. M., et al. (2015). Reading impairment in Duchenne muscular dystrophy: A pilot study to investigate similarities and differences with developmental dyslexia. *Research in Developmental Disabilities*. **45–46**, 168–177.
- Atkinson R. C. and Shiffrin R. M. (1971). The control of short-term memory. *Scientific American*. **225**, 82–90.
- Austin R. C., Howard P. L., D'Souza V. N., Klamut H. J. and Ray P. N. (1995). Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71. *Human Molecular Genetics*. **4**, 1475–83.
- Baddeley A. (1998). Working memory.
- Baddeley A. (2010). Working memory. *Current Biology*. **20**, R136–R140.
- Banihani R., Smile S., Yoon G., Dupuis a., Mosleh M., Snider a. and McAdam L. (2015). Cognitive and Neurobehavioral Profile in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy. *Journal of Child Neurology*.
- Bar S., Barnea E., Levy Z., Neuman S., Yaffe D. and Nudel U. (1990). A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. *The Biochemical Journal*. **272**, 557–60.
- Barboni M. T. S., Martins C. M. G., Nagy B. V., Tsai T., Damico F. M., da Costa M. F., de Cassia R., Pavanello

- M., Lourenço N. C. V., de Cerqueira A. M. P., *et al.* (2016). Dystrophin Is Required for Proper Functioning of Luminance and Red-Green Cone Opponent Mechanisms in the Human Retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **57**, 3581–3587.
- Bardoni A., Felisari G., Sironi M., Comi G., Lai M., Robotti M. and Bresolin N. (2000). Loss of Dp140 regulatory sequences is associated with cognitive impairment in dystrophinopathies. *Neuromuscular Disorder*. **10**, 194–199.
- Bardoni A., Sironi M., Felisari G., Comi G. P. and Bresolin N. (1999). Absence of brain Dp140 isoform and cognitive impairment in Becker muscular dystrophy. *Lancet*. **353**, 897–898.
- Beastrom N., Lu H., Macke A., Canan B. D., Johnson E. K., Penton C. M., Kaspar B. K., Rodino-Klapac L. R., Zhou L., Janssen P. M. L., *et al.* (2011). mdx^(5cv) mice manifest more severe muscle dysfunction and diaphragm force deficits than do mdx Mice. *The American Journal of Pathology*. **179**, 2464–2474.
- Belmonte M. K. and Bourgeron T. (2006). Fragile X syndrome and autism at the intersection of genetic and neural networks. *Nature Neuroscience*. **9**, 1221–1225.
- Benabdesselam R., Sene A., Raison D., Benmessaoud-Mesbah O., Ayad G., Mornet D., Yaffe D., Rendon A., Hardin-Pouzet H. and Dorbani-Mamine L. (2010). A deficit of brain dystrophin 71 impairs hypothalamic osmostat. *Journal of Neuroscience Research*. **88**, 324–334.
- Bengtsson N. E., Hall J. K., Odom G. L., Phelps M. P., Andrus C. R., Hawkins R. D., Hauschka S. D., Chamberlain J. R. and Chamberlain J. S. (2017). Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Nature Communications*. **8**, 14454.
- Benony H. (1986). Approche psychopathologique des adolescents myopathes. *Perspectives Psychiatriques*. **2**, 110–124.
- Billard C., Gillet P., Barthez M., Hommet C. and Bertrand P. (1998). Reading ability and processing in Duchenne muscular dystrophy and spinal muscular atrophy. *Developmental Medicine and Child Neurology*. **40**, 12–20.
- Billard C., Gillet P., Signoret J. L., Uicaut E., Bertrand P., Fardeau M., Barthez-Carpentier M. a and Santini J. J. (1992). Cognitive functions in Duchenne muscular dystrophy: a reappraisal and comparison with spinal muscular atrophy. *Neuromuscular Disorders*. **2**, 371–378.
- Blake D. J., Hawkes R., Benson M. A. and Beesley P. W. (1999). Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia. *The Journal of Cell Biology*. **147**, 645–658.
- Blake D. J., Love D. R., Tinsley J., Morris G. E., Turley H., Gatter K., Dickson G., Edwards Y. H. and Davies K. E. (1992). Characterization of a 4.8kb transcript from the Duchenne muscular dystrophy locus expressed in Schwannoma cells. *Human Molecular Genetics*. **1**, 103–109.
- Blake D. J., Nawrotzki R., Loh N. Y., Górecki D. C. and Davies K. E. (1998). beta-dystrobrevin, a member of the dystrophin-related protein family. *PNAS*. **95**, 241–6.
- Blake D. J., Schofield J. N., Zuellig R. A., Górecki D. C., Phelps S. R., Barnard E. A., Edwards Y. H. and Davies K. E. (1995). G-utrophin, the autosomal homologue of dystrophin Dp116, is expressed in sensory ganglia and brain. *PNAS*. **92**, 3697–3701.
- Bortolini E. R. and Zatz M. (1987). Duchenne muscular dystrophy: comparison among different racial groups. *American Journal of Medical Genetics*. **28**, 925–9.
- Boulay A.-C., Saubaméa B., Cisternino S., Mignon V., Mazeraud A., Jourden L., Blugeon C. and Cohen-Salmon M. (2015). The Sarcoglycan complex is expressed in the cerebrovascular system and is specifically regulated by astroglial Cx30 channels. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. **9**, 9.
- Bower G. H., Gilligan S. G. and Monteiro K. P. (1981). Selectivity of learning caused by affective states. *Journal of Experimental Psychology: General*. **110**, 451–473.
- Brenman J. E., Chao D. S., Gee S. H., McGee A. W., Craven S. E., Santillano D. R., Wu Z., Huang F., Xia H., Peters M. F., *et al.* (1996). Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell*. **84**, 757–67.
- Bresolin N., Castelli E., Comi G. P., Felisari G., Bardoni A., Perani D., Grassi F., Turconi A., Mazzucchelli F. and Gallotti D. (1994). Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*. **4**, 359–369.
- de Brouwer A. P. M., Nabuurs S. B., Verhaart I. E. C., Oudakker A. R., Hordijk R., Yntema H. G., Hordijk-Hos J. M., Voeseek K., de Vries B. B. a, van Essen T., *et al.* (2014). A 3-base pair deletion, c.9711_9713del, in DMD results in intellectual disability without muscular dystrophy. *European Journal of Human Genetics*. **22**, 480–5.
- Bruggen H. W. V., Engel-Hoek L. V. D., Steenks M. H., Bilt a. V. D., Bronkhorst E. M., Creugers N. H. J., Groot I. J. M. D. and Kalaykova S. I. (2015). Fighting Against Disuse of the Masticatory System in

- Duchenne Muscular Dystrophy: A Pilot Study Using Chewing Gum. *Journal of Child Neurology*.
- Brüning I., Suter A., Knuesel I., Lüscher B. and Fritschy J.-M. (2002). GABAergic terminals are required for postsynaptic clustering of dystrophin but not of GABA(A) receptors and gephyrin. *The Journal of Neuroscience*. **22**, 4805–4813.
- Bushby K. M., Appleton R., Anderson L. V., Welch J. L., Kelly P. and Gardner-Medwin D. (1995). Deletion status and intellectual impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Developmental Medicine and Child Neurology*. **37**, 260–269.
- Byers T. J., Kunkel L. M. and Watkins S. C. (1991). The subcellular distribution of dystrophin in mouse skeletal, cardiac, and smooth muscle. *The Journal of Cell Biology*. **115**, 411–21.
- Byers T. J., Lidov H. G. and Kunkel L. M. (1993). An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nature Genetics*. **4**, 77–81.
- Carretta D., Santarelli M., Sbriccoli A., Pinto F., Catini C. and Minciocchi D. (2004). Spatial analysis reveals alterations of parvalbumin- and calbindin-positive local circuit neurons in the cerebral cortex of mutant mdx mice. *Brain Research*. **1016**, 1–11.
- Carretta D., Santarelli M., Vanni D., Ciabatti S., Sbriccoli A., Pinto F. and Minciocchi D. (2003). Cortical and brainstem neurons containing calcium-binding proteins in a murine model of Duchenne's muscular dystrophy: selective changes in the sensorimotor cortex. *The Journal of Comparative Neurology*. **456**, 48–59.
- Caston J., Chianale C. and Mariani J. (2004). Spatial memory of heterozygous staggerer (Rora(+)/Rora(sg)) versus normal (Rora(+)/Rora(+)) mice during aging. *Behavior Genetics*. **34**, 319–324.
- Cavaldesi M., Macchia G., Barca S., Defilippi P., Tarone G. and Petrucci T. C. (1999). Association of the dystroglycan complex isolated from bovine brain synaptosomes with proteins involved in signal transduction. *Journal of Neurochemistry*. **72**, 1648–1655.
- Chabout J., Cressant A., Hu X., Edeline J.-M. and Granon S. (2013). Making choice between competing rewards in uncertain vs. safe social environment: role of neuronal nicotinic receptors of acetylcholine. *Frontiers in Human Neuroscience*. **7**, 468.
- 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 Journal of Medical Genetics*. **16**, 21–30.
- Chapman V. M., Miller D. R., Armstrong D. and Caskey C. T. (1989). Recovery of induced mutations for X chromosome-linked muscular dystrophy in mice. *PNAS*. **86**, 1292–6.
- Chávez O., Harricane M. C., Alemán V., Dorbani L., Larroque C., Mornet D., Rendon A. and Martínez-Rojas D. (2000). Mitochondrial expression of a short dystrophin-like product with molecular weight of 71 kDa. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **274**, 275–280.
- Chelly J., Hamard G., Koulakoff A., Kaplan J. C., Kahn A. and Berwald-Netter Y. (1990). Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial cells. *Nature*. **344**, 64–65.
- Chen J., Yu S., Fu Y. and Li X. (2014). Synaptic proteins and receptors defects in autism spectrum disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. **8**, 1–13.
- Chieffo D., Brogna C., Berardinelli A., D'Angelo G., Mallardi M., D'Amico A., Alfieri P., Mercuri E. and Pane M. (2015). Early Neurodevelopmental Findings Predict School Age Cognitive Abilities in Duchenne Muscular Dystrophy: A Longitudinal Study. *PLoS One*. **10**, e0133214.
- Cia D., Simonutti M., Fort P. E., Doly M. and Rendon A. (2014). Slight Alteration of the Electroretinogram in Mice Lacking Dystrophin Dp71. *Ophthalmic Research*. **51**, 196–203.
- Cibis G. W. and Fitzgerald K. M. (2001). The negative ERG is not synonymous with nightblindness. *Transactions of the American Ophthalmological Society*. **99**, 171–5–6.
- Cibis G. W., Fitzgerald K. M., Harris D. J., Rothberg P. G. and Rupani M. (1993). The effects of dystrophin gene mutations on the ERG in mice and humans. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **34**, 3646–52.
- Claudepierre T., Dalloz C., Mornet D., Matsumura K., Sahel J. and Rendon A. (2000). Characterization of the intermolecular associations of the dystrophin-associated glycoprotein complex in retinal Müller glial cells. *Journal of Cell Science*. **113 Pt 19**, 3409–3417.
- Claudepierre T., Rodius F., Frasson M., Fontaine V., Picaud S., Dreyfus H., Mornet D. and Rendon A. (1999). Differential distribution of dystrophins in rat retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **40**, 1520–1529.
- Coccorello R., Castellano C., Paggi P., Mele A. and Oliverio A. (2002). Genetically dystrophic mdx/mdx mice exhibit decreased response to nicotine in passive avoidance. *Neuroreport*. **13**, 1219–1222.

- Cohen E. J., Quarta E., Fulgenzi G. and Minciacchi D. (2015). Acetylcholine, GABA and neuronal networks: A working hypothesis for compensations in the dystrophic brain. *Brain Research Bulletin*. **110**, 1–13.
- Connolly A. M., Florence J. M., Cradock M. M., Malkus E. C., Schierbecker J. R., Siener C. A., Wulf C. O., Anand P., Golumbek P. T., Zaidman C. M., *et al.* (2013). Motor and cognitive assessment of infants and young boys with Duchenne Muscular Dystrophy: results from the Muscular Dystrophy Association DMD Clinical Research Network. *Neuromuscular Disorders*. **23**, 529–539.
- Connors N. C., Adams M. E., Froehner S. C. and Kofuji P. (2004). The potassium channel Kir4.1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia. *The Journal of Biological Chemistry*. **279**, 28387–28392.
- Costa M. F., Oliveira A. G. F., Feitosa-Santana C., Zatz M. and Ventura D. F. (2007). Red-green color vision impairment in Duchenne muscular dystrophy. *American Journal of Human Genetics*. **80**, 1064–1075.
- Cotton S. M., Voudouris N. J. and Greenwood K. M. (2005). Association between intellectual functioning and age in children and young adults with Duchenne muscular dystrophy: further results from a meta-analysis. *Developmental Medicine and Child Neurology*. **47**, 257–265.
- Cotton S., Voudouris N. J. and Greenwood K. M. (2001). Intelligence and Duchenne muscular dystrophy: full-scale, verbal, and performance intelligence quotients. *Developmental Medicine and Child Neurology*. **43**, 497–501.
- Covone A. E., Lerone M. and Romeo G. (1991). Genotype-phenotype correlation and germline mosaicism in DMD/BMD patients with deletions of the dystrophin gene. *Human Genetics*. **87**, 353–360.
- Cowan N. (2001). The magical number 4 in short-term memory: a reconsideration of mental storage capacity. *The Behavioral and Brain Sciences*. **24**, 87–114–85.
- Cox G. A., Phelps S. F., Chapman v. M. and Chamberlain J. S. (1993). New mdx mutation disrupts expression of muscle and nonmuscle isoforms of dystrophin. *Nature Genetics*. **4**, 87–93.
- Craig A. M. and Kang Y. (2007). Neurexin-neurologin signaling in synapse development. *Current Opinion in Neurobiology*. **17**, 43–52.
- Craig F., Margari F., Legrottaglie A. R., Palumbi R., de Giambattista C. and Margari L. (2016). A review of executive function deficits in autism spectrum disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. **12**, 1191–1202.
- Crosbie R. H., Lebakken C. S., Holt K. H., Venzke D. P., Straub V., Lee J. C., Grady R. M., Chamberlain J. S., Sanes J. R. and Campbell K. P. (1999). Membrane targeting and stabilization of sarcospan is mediated by the sarcoglycan subcomplex. *The Journal of Cell Biology*. **145**, 153–65.
- Cyrułnik S. E., Fee R. J., De Vivo D. C., Goldstein E. and Hinton V. J. (2007). Delayed Developmental Language Milestones in Children with Duchenne's Muscular Dystrophy. *Journal of Pediatrics*. **150**, 474–478.
- Cyrułnik S. E. and Hinton V. J. (2008). Duchenne muscular dystrophy: A cerebellar disorder? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. **32**, 486–496.
- Dague P. and Temboury M. (1974). Les aspects psychologiques dans la myopathie Duchenne de Boulogne. Données récentes. *Bulletin de Psychologie*. **27**, 304–316.
- Dallérac G., Perronnet C., Chagneau C., Leblanc-Veyrac P., Samson-Desvignes N., Peltekian E., Danos O., Garcia L., Laroche S., Billard J. M., *et al.* (2011). Rescue of a dystrophin-like protein by exon skipping normalizes synaptic plasticity in the hippocampus of the mdx mouse. *Neurobiology of Disease*. **43**, 635–641.
- Dalloz C., Sarig R., Fort P., Yaffe D., Bordais A., Pannicke T., Grosche J., Mornet D., Reichenbach A., Sahel J., *et al.* (2003). Targeted inactivation of dystrophin gene product Dp71: phenotypic impact in mouse retina. *Human Molecular Genetics*. **12**, 1543–1554.
- D'Angelo M. G., Lorusso M. L., Civati F., Comi G. P., Magri F., Del Bo R., Guglieri M., Molteni M., Turconi A. C. and Bresolin N. (2011). Neurocognitive profiles in Duchenne muscular dystrophy and gene mutation site. *Pediatric Neurology*. **45**, 292–9.
- Danko I., Chapman v. and Wolff J. A. (1992). The frequency of revertants in mdx mouse genetic models for Duchenne muscular dystrophy. *Pediatric Research*. **32**, 128–131.
- Daoud F., Angeard N., Demerre B., Martie I., Benyaou R., Leturcq F., Cossée M., Deburgrave N., Saillour Y., Tuffery S., *et al.* (2009a). Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression. *Human Molecular Genetics*. **18**, 3779–3794.
- Daoud F., Candelario-Martínez A., Billard J. M., Avital A., Khelfaoui M., Rozenvald Y., Guegan M., Mornet D., Jaillard D., Nudel U., *et al.* (2009b). Role of Mental Retardation-Associated Dystrophin-Gene Product

- Dp71 in Excitatory Synapse Organization, Synaptic Plasticity and Behavioral Functions. *PLoS ONE*. **4**.
- De Sarro G., Ibbadu G. F., Marra R., Rotiroti D., Loiacono A., Donato Di Paola E. and Russo E. (2004). Seizure susceptibility to various convulsant stimuli in dystrophin-deficient mdx mice. *Neuroscience Research*. **50**, 37–44.
- De Smet H. J., Paquier P., Verhoeven J. and Mariën P. (2013). The cerebellum: its role in language and related cognitive and affective functions. *Brain and Language*. **127**, 334–342.
- Decrouy A., Renaud J. M., Davis H. L., Lunde J. A., Dickson G. and Jasmin B. J. (1997). Mini-dystrophin gene transfer in mdx4cv diaphragm muscle fibers increases sarcolemmal stability. *Gene Therapy*. **4**, 401–408.
- Del Tongo C., Carretta D., Fulgenzi G., Catini C. and Minciacchi D. (2009). Parvalbumin-positive GABAergic interneurons are increased in the dorsal hippocampus of the dystrophic mdx mouse. *Acta Neuropathologica*. **118**, 803–812.
- Desguerre I., Christov C., Mayer M., Zeller R., Becane H. M., Bastuji-Garin S., Leturcq F., Chiron C., Chelly J. and Gherardi R. K. (2009). Clinical heterogeneity of Duchenne muscular dystrophy (DMD): Definition of sub-phenotypes and predictive criteria by long-term follow-up. *PLoS ONE*. **4**.
- Desmond J. E., Gabrieli J. D., Wagner a D., Ginier B. L. and Glover G. H. (1997). Lobular patterns of cerebellar activation in verbal working-memory and finger-tapping tasks as revealed by functional MRI. *The Journal of Neuroscience*. **17**, 9675–9685.
- Dickson P. E., Rogers T. D., Del Mar N., Martin L. A., Heck D., Blaha C. D., Goldowitz D. and Mittleman G. (2010). Behavioral flexibility in a mouse model of developmental cerebellar Purkinje cell loss. *Neurobiology of Learning and Memory*. **94**, 220–228.
- Dodson H. C., Piper T. a., Clarke J. D. W., Quinlivan R. M. and Dickson G. (1995). Dystrophin expression in the hair cells of the cochlea. *Journal of Neurocytology*. **24**, 625–632.
- Dorman C., Hurley A. D. and D'Avignon J. (1988). Language and learning disorders of older boys with Duchenne muscular dystrophy. *Developmental Medicine and Child Neurology*. **30**, 316–327.
- D'Souza V. N., Nguyen T. M., Morris G. E., Karges W., Pillers D. A. and Ray P. N. (1995). A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Human Molecular Genetics*. **4**, 837–842.
- Dubowitz V. (2013). Steroids in Duchenne dystrophy. *Neuromuscular Disorders : NMD*. **23**, 527–8.
- Duchenne G. (1861). De l'électrisation localisée et de son application à la pathologie et à la thérapeutique.
- Duchenne G. (1868). De la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique.
- den Dunnen J. T., Casula L., Makover A., Bakker B., Yaffe D., Nudel U. and van Ommen G. J. (1991). Mapping of dystrophin brain promoter: a deletion of this region is compatible with normal intellect. *Neuromuscular Disorders*. **1**, 327–331.
- Eagle M., Baudouin S. V., Chandler C., Giddings D. R., Bullock R. and Bushby K. (2002). Survival in Duchenne muscular dystrophy: Improvements in life expectancy since 1967 and the impact of home nocturnal ventilation. *Neuromuscular Disorders*. **12**, 926–929.
- Ebbinghaus H. and Galliker M. (2011). Über das Gedächtnis: Untersuchungen zur experimentellen Psychologie Darmstadt: WBG, Wiss. Buchges.
- El Mathari B., Sene A., Charles-Messance H., Vacca O., Guillonnet X., Grepin C., Sennlaub F., Sahel J.-A., Rendon A. and Tadayoni R. (2015). Dystrophin Dp71 gene deletion induces retinal vascular inflammation and capillary degeneration. *Human Molecular Genetics*. **24**, 3939–47.
- Emery A. E. and Emery M. L. (1993). Edward Meryon (1809-1880) and muscular dystrophy. *Journal of Medical Genetics*. **30**, 506–11.
- Emery A. E. H. and Emery M. L. H. (2011). The History of a Genetic Disease: Duchenne Muscular Dystrophy or Meryon's Disease Oxford University Press.
- Emery A. E. H., Muntoni F. and Quinlivan R. C. M. (2015). Duchenne Muscular Dystrophy Oxford University Press.
- Ervasti J. M. (2007). Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1772**, 108–17.
- Ervasti J. M., Ohlndieck K., Kahl S. D., Gaver M. G. and Campbell K. P. (1990). Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature*. **345**, 315–9.
- Esclassan F., Coutureau E., Di Scala G. and Marchand A. R. (2009a). A cholinergic-dependent role for the entorhinal cortex in trace fear conditioning. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*. **29**, 8087–93.
- Esclassan F., Coutureau E., Di Scala G. and Marchand A. R. (2009b). Differential contribution of

- dorsal and ventral hippocampus to trace and delay fear conditioning. *Hippocampus*. **19**, 33–44.
- Ettinger A. J., Feng G. and Sanes J. R. (1997). epsilon-Sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *The Journal of Biological Chemistry*. **272**, 32534–32538.
- Fanselow M. S., Kim J. J., Yipp J. and De Oca B. (1994). Differential effects of the N-methyl-D-aspartate antagonist DL-2-amino-5-phosphonovalerate on acquisition of fear of auditory and contextual cues. *Behavioral Neuroscience*. **108**, 235–240.
- Fee R. J. and Hinton V. J. (2011). Resilience in Children Diagnosed With a Chronic Neuromuscular Disorder. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*. **32**, 644–650.
- Felisari G., Martinelli Boneschi F., Bardoni A., Sironi M., Comi G. P., Robotti M., Turconi A. C., Lai M., Corrao G. and Bresolin N. (2000). Loss of Dp140 dystrophin isoform and intellectual impairment in Duchenne dystrophy. *Neurology*. **55**, 559–564.
- Fitzgerald K. G. and Caro F. G. (2014). An overview of age-friendly cities and communities around the world. *Journal of Aging & Social Policy*. **26**, 1–18.
- Fitzgerald K. M., Cibis G. W., Gettel A. H., Rinaldi R., Harris D. J. and White R. A. (1999). ERG phenotype of a dystrophin mutation in heterozygous female carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Medical Genetics*. **36**, 316–22.
- Fitzgerald K. M., Cibis G. W., Giambone S. A. and Harris D. J. (1994). Retinal signal transmission in Duchenne muscular dystrophy: evidence for dysfunction in the photoreceptor/depolarizing bipolar cell pathway. *The Journal of Clinical Investigation*. **93**, 2425–30.
- Fitzpatrick C., Barry C. and Garvey C. (1986). Psychiatric disorder among boys with Duchenne muscular dystrophy. *Developmental Medicine and Child Neurology*. **28**, 589–595.
- Friedman N. P. and Miyake A. (2016). Unity and diversity of executive functions: Individual differences as a window on cognitive structure. *Cortex; a Journal Devoted to the Study of the Nervous System and Behavior*.
- Fritschy J.-M., Panzanelli P. and Tyagarajan S. K. (2012). Molecular and functional heterogeneity of GABAergic synapses. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **69**, 2485–2499.
- Fritschy M., Schweizer C. and Br I. (2003). Pre- and post-synaptic mechanisms regulating the clustering of type A γ -aminobutyric acid receptors (GABA A receptors). *Biochemical Society Transactions*. 889–892.
- Fuenzalida M., Espinoza C., Pérez M. Á., Tapia-Rojas C., Cuitino L., Brandan E. and Inestrosa N. C. (2016). Wnt signaling pathway improves central inhibitory synaptic transmission in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Neurobiology of Disease*. **86**, 109–120.
- Fujimoto T., Itoh K., Yaoi T. and Fushiki S. (2014). Somatodendritic and excitatory postsynaptic distribution of neuron-type dystrophin isoform, Dp40, in hippocampal neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **452**, 79–84.
- Gardner-Medwin D., Bunday S. and Green S. (1978). Early diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *Lancet*. **1**, 1102.
- Gee S. H., Madhavan R., Levinson S. R., Caldwell J. H., Sealock R. and Froehner S. C. (1998). Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. **18**, 128–37.
- Ghedini P. C., Avellar M. C. W., De Lima T. C. M., Lima-Landman M. T. R., Lapa A. J. and Souccar C. (2012). Quantitative changes of nicotinic receptors in the hippocampus of dystrophin-deficient mice. *Brain Research*. **1483**, 96–104.
- Giliberto F., Ferreiro V., Dalamon V. and Szijan I. (2004). Dystrophin deletions and cognitive impairment in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neurological Research*. **26**, 83–87.
- Giocanti-Auregan A., Vacca O., Bénard R., Cao S., Siqueiros L., Montañez C., Paques M., Sahel J.-A., Sennlaub F., Guillonnet X., et al. (2016). Altered astrocyte morphology and vascular development in dystrophin-Dp71-null mice. *Glia*. **64**, 716–729.
- González E., Montañez C., Ray P. N., Howard P. L., García-Sierra F., Mornet D. and Cisneros B. (2000). Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of dystrophin Dp71. *FEBS Letters*. **482**, 209–214.
- Górecki D. C. and Barnard E. A. (1995). Specific expression of G-dystrophin (Dp71) in the brain. *Neuroreport*. **6**, 893–896.
- Gourévitch B., Doisy T., Avillac M. and Edeline J. M. (2009). Follow-up of latency and threshold shifts of auditory brainstem responses after single and interrupted acoustic trauma in guinea pig. *Brain Research*. **1304**, 66–79.

- Goyenvalle A., Griffith G., Babbs A., El Andaloussi S., Ezzat K., Avril A., Dugovic B., Chaussenot R., Ferry A., Voit T., *et al.* (2015). Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. *Nature Medicine*. **21**, 270–5.
- Grady R. M., Wozniak D. F., Ohlemiller K. K. and Sanes J. R. (2006). Cerebellar synaptic defects and abnormal motor behavior in mice lacking alpha- and beta-dystrobrevin. *The Journal of Neuroscience*. **26**, 2841–2851.
- Granger R., Staubli U., Davis M., Perez Y., Nilsson L., Rogers G. A. and Lynch G. (1993). A drug that facilitates glutamatergic transmission reduces exploratory activity and improves performance in a learning-dependent task. *Synapse*. **15**, 326–329.
- Guadagno E. and Moukhles H. (2004). Laminin-induced aggregation of the inwardly rectifying potassium channel, Kir4.1, and the water-permeable channel, AQP4, via a dystroglycan-containing complex in astrocytes. *Glia*. **47**, 138–49.
- Hendriksen J. G. M. and Vles J. S. H. (2008). Neuropsychiatric disorders in males with duchenne muscular dystrophy: frequency rate of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorder, and obsessive–compulsive disorder. *Journal of Child Neurology*. **23**, 477–481.
- Hendriksen R. G. F., Hoogland G., Schipper S., Hendriksen J. G. M., Vles J. S. H. and Aalbers M. W. (2015). A possible role of dystrophin in neuronal excitability: a review of the current literature. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. **51**, 255–62.
- Herrera-Salazar A., García-Villegas R., Aragón J., Sánchez-Trujillo A., Ceja V., Martínez-Herrera A., Merino-Jiménez C. and Montañez C. (2016). Overexpression of mutant dystrophin Dp71⁷⁸⁹ stimulates cell proliferation. *Neuroreport*. **27**, 6–11.
- Herry C. and Johansen J. P. (2014). Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. *Nature Publishing Group*. **17**, 1644–1654.
- Hill E., Berthoz S. and Frith U. (2004). Brief report: cognitive processing of own emotions in individuals with autistic spectrum disorder and in their relatives. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. **34**, 229–235.
- Hill E. L. (2004). Executive dysfunction in autism. *Trends in Cognitive Sciences*. **8**, 26–32.
- Hinton V. J., De Vivo D. C., Nereo N. E., Goldstein E. and Stern Y. (2000). Poor verbal working memory across intellectual level in boys with Duchenne dystrophy. *Neurology*. **54**, 2127–2132.
- Hinton V. J., Fee R., Goldstein E. and Stern Y. (2004). Investigation of Poor Academic Achievement in Children with Duchenne Muscular Dystrophy. *Learning Disabilities Research & Practice*. **19**, 146–154.
- Hinton V. J., Fee R. J., De Vivo D. C. and Goldstein E. (2007a). Poor facial affect recognition among boys with Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. **37**, 1925–1933.
- Hinton V. J., Fee R. J., Goldstein E. M. and De Vivo D. C. (2007b). Verbal and memory skills in males with Duchenne muscular dystrophy. *Developmental Medicine and Child Neurology*. **49**, 123–128.
- Hinton V. J., Nereo N. E., Fee R. J. and Cyrulnik S. E. (2006). Social behavior problems in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics*. **27**, 470–476.
- Hodgson S. V., Abbs S., Clark S., Manzur A., Heckmatt J. Z., Dubowitz V. and Bobrow M. (1992). Correlation of clinical and deletion data in Duchenne and Becker muscular dystrophy, with special reference to mental ability. *Neuromuscular Disorders*. **2**, 269–276.
- Hogan A., Shepherd L., Chabot J., Quenneville S., Prescott S. M., Topham M. K. and Gee S. H. (2001). Interaction of gamma 1-syntrophin with diacylglycerol kinase-zeta. Regulation of nuclear localization by PDZ interactions. *The Journal of Biological Chemistry*. **276**, 26526–33.
- Howard P. L., Dally G. Y., Ditta S. D., Austin R. C., Worton R. G., Klamut H. J. and Ray P. N. (1999). Dystrophin isoforms DP71 and DP427 have distinct roles in myogenic cells. *Muscle & Nerve*. **22**, 16–27.
- Howard P. L., Klamut H. J. and Ray P. N. (1998). Identification of a novel actin binding site within the Dp71 dystrophin isoform. *FEBS Letters*. **441**, 337–341.
- Hugnot J. P., Gilgenkrantz H., Vincent N., Chafey P., Morris G. E., Monaco A. P., Berwald-Netter Y., Koulakoff A., Kaplan J. C. and Kahn A. (1992). Distal transcript of the dystrophin gene initiated from an alternative first exon and encoding a 75-kDa protein widely distributed in nonmuscle tissues. *PNAS*. **89**, 7506–7510.
- Humphrey E. L., Lacey E., Le L. T., Feng L., Sciandra F., Morris C. R., Hewitt J. E., Holt I., Brancaccio A., Barresi R., *et al.* (2015). A new monoclonal antibody DAG-6F4 against human alpha-dystroglycan reveals reduced core protein in some, but not all, dystroglycanopathy patients. *Neuromuscular Disorders*. **25**, 32–42.
- 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.
- Im W. B., Phelps S. F., Copen E. H., Adams E. G., Slightom J. L. and Chamberlain J. S. (1996). Differential expression of dystrophin isoforms in strains of mdx mice with different mutations. *Human Molecular Genetics*. **5**, 1149–1153.
- Imamura M. and Ozawa E. (1998). Differential expression of dystrophin isoforms and utrophin during dibutyl-tyrosyl-cAMP-induced morphological differentiation of rat brain astrocytes. *PNAS*. **95**, 6139–6144.
- Jung D., Filliol D., Metz-Boutigue M. H. and Rendon A. (1993). Characterization and subcellular localization of the dystrophin-protein 71 (Dp71) from brain. *Neuromuscular Disorders*. **3**, 515–8.
- Kim T. W., Wu K. and Black I. B. (1995). Deficiency of brain synaptic dystrophin in human Duchenne muscular dystrophy. *Annals of Neurology*. **38**, 446–449.
- Kim T. W., Wu K., Xu J. L. and Black I. B. (1992). Detection of dystrophin in the postsynaptic density of rat brain and deficiency in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *PNAS*. **89**, 11642–11644.
- Kleinginna P. R. and Kleinginna A. M. (1981). A categorized list of motivation definitions, with a suggestion for a consensual definition. *Motivation and Emotion*. **5**, 263–291.
- Knuesel I., Mastrocola M., Zuellig R. a., Bornhauser B., Schaub M. C. and Fritschy J. M. (1999). Altered synaptic clustering of GABA(A) receptors in mice lacking dystrophin (mdx mice). *European Journal of Neuroscience*. **11**, 4457–4462.
- 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.
- Komoto J., Usui S., Otsuki S. and Terao A. (1984). Infantile autism and Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. **14**, 191–195.
- Koziol L. F., Budding D. E. and Chidekel D. (2011). Sensory integration, sensory processing, and sensory modulation disorders: putative functional neuroanatomic underpinnings. *Cerebellum*. **10**, 770–92.
- Krogsgaard-Larsen P., Johnston G. A., Lodge D. and Curtis D. R. (1977). A new class of GABA agonist. *Nature*. **268**, 53–55.
- Kueh S. L. L., Dempster J., Head S. I. and Morley J. W. (2011). Reduced postsynaptic GABAA receptor number and enhanced gaboxadol induced change in holding currents in Purkinje cells of the dystrophin-deficient mdx mouse. *Neurobiology of Disease*. **43**, 558–64.
- Landfeldt E., Lindgren P., Bell C. F., Schmitt C., Guglieri M., Straub V., Lochmüller H. and Bushby K. (2014). The burden of Duchenne muscular dystrophy: An international, cross-sectional study. *Neurology*. **83**, 529–536.
- Lartseva A., Dijkstra T. and Buitelaar J. K. (2014). Emotional language processing in autism spectrum disorders: a systematic review. *Frontiers in Human Neuroscience*. **8**, 991.
- Lazarus R. S. (1991). Cognition and motivation in emotion. *The American Psychologist*. **46**, 352–67.
- Lederfein D., Levy Z., Augier N., Mornet D., Morris G., Fuchs O., Yaffe D. and Nudel U. (1992). A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues. *PNAS*. **89**, 5346–5350.
- LeDoux J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience*. **23**, 155–84.
- Lee E., Lee J. and Kim E. (2016). Excitation/Inhibition Imbalance in Animal Models of Autism Spectrum Disorders. *Biological Psychiatry*.
- Lee H. and Kim J. J. (1998). Amygdalar NMDA receptors are critical for new fear learning in previously fear-conditioned rats. *The Journal of Neuroscience*. **18**, 8444–8454.
- Leggio M. G., Neri P., Graziano A., Mandolesi L., Molinari M. and Petrosini L. (1999). Cerebellar contribution to spatial event processing: characterization of procedural learning. *Experimental Brain Research*. **127**, 1–11.
- Leibovitz S., Meshorer A., Fridman Y., Wieneke S., Jockusch H., Yaffe D. and Nudel U. (2002). Exogenous Dp71 is a dominant negative competitor of dystrophin in skeletal muscle. *Neuromuscular Disorders*. **12**, 836–844.
- Leibowitz D. and Dubowitz V. (1981). Intellect and behaviour in Duchenne muscular dystrophy. *Developmental Medicine and Child Neurology*. **23**, 577–90.
- Lemaire C., Heilig R. and Mandel J. L. (1988). The chicken dystrophin cDNA: striking conservation of the C-terminal coding and 3' untranslated regions between man and chicken. *The EMBO Journal*. **7**, 4157–62.

- Lenk U., Hanke R., Thiele H. and Speer A. (1993). Point mutations at the carboxy terminus of the human dystrophin gene: implications for an association with mental retardation in DMD patients. *Human Molecular Genetics*. **2**, 1877–1881.
- de León M. B., Montañez C., Gómez P., Morales-Lázaro S. L., Tapia-Ramírez V., Valadez-Graham V., Recillas-Targa F., Yaffe D., Nudel U. and Cisneros B. (2005). Dystrophin Dp71 expression is down-regulated during myogenesis: role of Sp1 and Sp3 on the Dp71 promoter activity. *The Journal of Biological Chemistry*. **280**, 5290–5299.
- Leonoudakis D., Conti L. R., Anderson S., Radeke C. M., McGuire L. M. M., Adams M. E., Froehner S. C., Yates J. R. and Vandenberg C. A. (2004). Protein trafficking and anchoring complexes revealed by proteomic analysis of inward rectifier potassium channel (Kir2.x)-associated proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. **279**, 22331–22346.
- Lévi S., Grady R. M., Henry M. D., Campbell K. P., Sanes J. R. and Craig A. M. (2002). Dystroglycan is selectively associated with inhibitory GABAergic synapses but is dispensable for their differentiation. *The Journal of Neuroscience*. **22**, 4274–4285.
- Li D., Yue Y. and Duan D. (2008). Preservation of muscle force in Mdx3cv mice correlates with low-level expression of a near full-length dystrophin protein. *The American Journal of Pathology*. **172**, 1332–1341.
- Lidov H. G. and Kunkel L. M. (1997). Dp140: alternatively spliced isoforms in brain and kidney. *Genomics*. **45**, 132–9.
- Lidov H. G., Selig S. and Kunkel L. M. (1995). Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Human Molecular Genetics*. **4**, 329–35.
- Lidov H. G. W., Byers T. J. and Kunkel L. M. (1993). The distribution of dystrophin in the murine central nervous system: An immunocytochemical study. *Neuroscience*. **54**, 167–187.
- Lindlöf M., Kiuru A., Kääriäinen H., Kalimo H., Lang H., Pihko H., Rapola J., Somer H., Somer M. and Savontaus M. L. (1989). Gene deletions in X-linked muscular dystrophy. *American Journal of Human Genetics*. **44**, 496–503.
- Lord C., Rutter M. and Le Couteur A. (1994). Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. **24**, 659–685.
- Lorusso M. L., Civati F., Molteni M., Turconi A. C., Bresolin N. and D'Angelo M. G. (2013). Specific profiles of neurocognitive and reading functions in a sample of 42 Italian boys with Duchenne Muscular Dystrophy. *Child Neuropsychology*. **19**, 350–69.
- Lue Y.-J., Chen S.-S. and Lu Y.-M. (2016). Quality of life of patients with Duchenne muscular dystrophy: from adolescence to young men. *Disability and Rehabilitation*. 1–6.
- Magri F., Govoni A., D'Angelo M. G., Del Bo R., Ghezzi S., Sandra G., Turconi A. C., Sciacco M., Ciscato P., Bordoni A., et al. (2011). Genotype and phenotype characterization in a large dystrophinopathic cohort with extended follow-up. *Journal of Neurology*. **258**, 1610–1623.
- Mah J. K., Korngut L., Dykeman J., Day L., Pringsheim T. and Jette N. (2014). A systematic review and meta-analysis on the epidemiology of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*. **24**, 482–491.
- Makkar S. R., Zhang S. Q. and Cranney J. (2010). Behavioral and neural analysis of GABA in the acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of fear memory. *Neuropsychopharmacology*. **35**, 1625–52.
- Maren S. (1996). Synaptic transmission and plasticity in the amygdala. An emerging physiology of fear conditioning circuits. *Molecular Neurobiology*. **13**, 1–22.
- Matzel L. D. and Kolata S. (2010). Selective attention, working memory, and animal intelligence. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. **34**, 23–30.
- McGreevy J. W., Hakim C. H., McIntosh M. a. and Duan D. (2015). Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Disease Models & Mechanisms*. **8**, 195–213.
- McNally E. M., Ly C. T. and Kunkel L. M. (1998). Human epsilon-sarcoglycan is highly related to alpha-sarcoglycan (adhelin), the limb girdle muscular dystrophy 2D gene. *FEBS Letters*. **422**, 27–32.
- Mehler M. F., Haas K. Z., Kessler J. A. and Stanton P. K. (1992). Enhanced sensitivity of hippocampal pyramidal neurons from mdx mice to hypoxia-induced loss of synaptic transmission. *PNAS*. **89**, 2461–2465.
- Mento G., Tarantino V. and Bisiacchi P. S. (2011). The neuropsychological profile of infantile Duchenne muscular dystrophy. *The Clinical Neuropsychologist*. **25**, 1359–77.
- Miller G., Tunnecliffe M. and Douglas P. S. (1985). IQ, prognosis and Duchenne muscular dystrophy. *Brain & Development*. **7**, 7–9.
- Miranda R., Laroche S. and Vaillend C. (2016). Reduced neuronal density in the CA1 anterodorsal

- hippocampus of the mdx mouse. *Neuromuscular Disorders*.
- Miranda R., Nagapin F., Bozon B., Laroche S., Aubin T. and Vaillend C. (2015). Altered social behavior and ultrasonic communication in the dystrophin-deficient mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Molecular Autism*. **6**, 60.
- Miranda R., Nudel U., Laroche S. and Vaillend C. (2011). Altered presynaptic ultrastructure in excitatory hippocampal synapses of mice lacking dystrophins Dp427 or Dp71. *Neurobiology of Disease*. **43**, 134–141.
- Miranda R., Sébrié C., Degrouard J., Gillet B., Jaillard D., Laroche S. and Vaillend C. (2009). Reorganization of inhibitory synapses and increased PSD length of perforated excitatory synapses in hippocampal area CA1 of dystrophin-deficient mdx mice. *Cerebral Cortex*. **19**, 876–88.
- Mirski K. T. and Crawford T. O. (2014). Motor and cognitive delay in Duchenne muscular dystrophy: implication for early diagnosis. *The Journal of Pediatrics*. **165**, 1008–1010.
- Mizoguchi K., Ishige A., Takeda S., Aburada M. and Tabira T. (2004). Endogenous glucocorticoids are essential for maintaining prefrontal cortical cognitive function. *The Journal of Neuroscience*. **24**, 5492–9.
- Moizard M. P., Billard C., Toutain A., Berret F., Marmin N. and Moraine C. (1998). Are Dp71 and Dp140 brain dystrophin isoforms related to cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy? *American Journal of Medical Genetics*. **80**, 32–41.
- Moizard M. P., Toutain a, Fournier D., Berret F., Raynaud M., Billard C., Andres C. and Moraine C. (2000). Severe cognitive impairment in DMD: obvious clinical indication for Dp71 isoform point mutation screening. *European Journal of Human Genetics*. **8**, 552–556.
- Moore S. A., Saito F., Chen J., Michele D. E., Henry M. D., Messing A., Cohn R. D., Ross-Barta S. E., Westra S., Williamson R. A., *et al.* (2002). Deletion of brain dystroglycan recapitulates aspects of congenital muscular dystrophy. *Nature*. **418**, 422–5.
- Muntoni F., Brockington M., Torelli S. and Brown S. C. (2004). Defective glycosylation in congenital muscular dystrophies. *Current Opinion in Neurology*. **17**, 205–209.
- Muntoni F., Mateddu A. and Serra G. (1991). Passive avoidance behaviour deficit in the mdx mouse. *Neuromuscular Disorders*. **1**, 121–123.
- Muntoni F., Wilson L., Marrosu G., Marrosu M. G., Cianchetti C., Mestroni L., Ganau A., Dubowitz V. and Sewry C. (1995). A mutation in the dystrophin gene selectively affecting dystrophin expression in the heart. *The Journal of Clinical Investigation*. **96**, 693–699.
- Neely J. D., Amiry-Moghaddam M., Ottersen O. P., Froehner S. C., Agre P. and Adams M. E. (2001). Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *PNAS*. **98**, 14108–14113.
- Nereo N. E., Fee R. J. and Hinton V. J. (2003). Parental stress in mothers of boys with Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Pediatric Psychology*. **28**, 473–484.
- Nicholson L. V., Johnson M. A., Bushby K. M., Gardner-Medwin D., Curtis A., Ginjaar I. B., den Dunnen J. T., Welch J. L., Butler T. J. and Bakker E. (1993). Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical, and histopathological data. Part 1. Trends across the clinical groups. *Journal of Medical Genetics*. **30**, 728–736.
- Nico B., Paola Nicchia G., Frigeri A., Corsi P., Mangieri D., Ribatti D., Svelto M. and Roncali L. (2004). Altered blood-brain barrier development in dystrophic MDX mice. *Neuroscience*. **125**, 921–935.
- Nigro G. (2010). One-hundred-seventy-five years of Neapolitan contributions to the fight against the muscular diseases. *Acta Myologica*. **29**, 369–91.
- Nishio H., Takeshima Y., Narita N., Yanagawa H., Suzuki Y., Ishikawa Y., Ishikawa Y., Minami R., Nakamura H. and Matsuo M. (1994). Identification of a novel first exon in the human dystrophin gene and of a new promoter located more than 500 kb upstream of the nearest known promoter. *The Journal of Clinical Investigation*. **94**, 1037–1042.
- Nudel U., Zuk D., Einat P., Zeelon E., Levy Z., Neuman S. and Yaffe D. (1989). Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. *Nature*. **337**, 76–78.
- Pane M., Lombardo M. E., Alfieri P., D'Amico A., Bianco F., Vasco G., Piccini G., Mallardi M., Romeo D. M., Ricotti V., *et al.* (2012). Attention deficit hyperactivity disorder and cognitive function in Duchenne muscular dystrophy: phenotype-genotype correlation. *The Journal of Pediatrics*. **161**, 705–709.e1.
- Pane M., Scalise R., Berardinelli A., D'Angelo G., Ricotti V., Alfieri P., Moroni I., Hartley L., Pera M. C., Baranello G., *et al.* (2013). Early neurodevelopmental assessment in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*. **23**, 451–455.
- Pangalila R. F., van den Bos G. a., Bartels B., Bergen M., Stam H. J. and Roebroek M. E. (2015).

- Prevalence of Fatigue, Pain, and Affective Disorders in Adults With Duchenne Muscular Dystrophy and Their Associations With Quality of Life. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. **96**, 1242–1247.
- Parames S. F., Coletta-Yudice E. D., Nogueira F. M., Nering de Sousa M. B., Hayashi M. A., Lima-Landman M. T. R., Lapa A. J. and Souccar C. (2014). Altered acetylcholine release in the hippocampus of dystrophin-deficient mice. *Neuroscience*. **269**, 173–183.
- Pastoret C. and Sebillé A. (1995). Mdx Mice Show Progressive Weakness and Muscle Deterioration With Age. *Journal of the Neurological Sciences*. **129**, 97–105.
- Pehler S. R. and Craft-Rosenberg M. (2009). Longing: The Lived Experience of Spirituality in Adolescents with Duchenne Muscular Dystrophy. *Journal of Pediatric Nursing*. **24**, 481–494.
- Perronnet C., Chagneau C., Le Blanc P., Samson-Desvignes N., Mornet D., Laroche S., De La Porte S. and Vaillend C. (2012). Upregulation of brain utrophin does not rescue behavioral alterations in dystrophin-deficient mice. *Human Molecular Genetics*. **21**, 2263–76.
- Perronnet C. and Vaillend C. (2010). Dystrophins, utrophins, and associated scaffolding complexes: Role in mammalian brain and implications for therapeutic strategies. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. **2010**,.
- Petrosini L., Molinari M. and Dell'Anna M. E. (1996). Cerebellar contribution to spatial event processing: Morris water maze and T-maze. *The European Journal of Neuroscience*. **8**, 1882–1896.
- Pillers D. A., Bulman D. E., Weleber R. G., Sigismund D. A., Musarella M. A., Powell B. R., Murphey W. H., Westall C., Panton C. and Becker L. E. (1993). Dystrophin expression in the human retina is required for normal function as defined by electroretinography. *Nature Genetics*. **4**, 82–86.
- Pillers D. A., Fitzgerald K. M., Duncan N. M., Rash S. M., White R. A., Dwinell S. J., Powell B. R., Schnur R. E., Ray P. N., Cibis G. W., *et al.* (1999). Duchenne/Becker muscular dystrophy: correlation of phenotype by electroretinography with sites of dystrophin mutations. *Human Genetics*. **105**, 2–9.
- Pillers D. A., Weleber R. G., Woodward W. R., Green D. G., Chapman V. M. and Ray P. N. (1995). mdxCv3 mouse is a model for electroretinography of Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **36**, 462–6.
- Poysky J. (2007). Behavior patterns in Duchenne muscular dystrophy: Report on the Parent Project Muscular Dystrophy behavior workshop 8-9 of December 2006, Philadelphia, USA. *Neuromuscular Disorders*. **17**, 986–994.
- Prosser E. J., Murphy E. G. and Thompson M. W. (1969). Intelligence and the gene for Duchenne muscular dystrophy. *Archives of Disease in Childhood*. **44**, 221–230.
- Rafael J. A., Nitta Y., Peters J. and Davies K. E. (2000). Testing of SHIRPA, a mouse phenotypic assessment protocol, on Dmd(mdx) and Dmd(mdx3cv) dystrophin-deficient mice. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society*. **11**, 725–728.
- Rahimov F. and Kunkel L. M. (2013). The cell biology of disease: cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy. *The Journal of Cell Biology*. **201**, 499–510.
- Rapaport D., Passos-Bueno M. R., Brandão L., Love D., Vainzof M. and Zatz M. (1991). Apparent association of mental retardation and specific patterns of deletions screened with probes cf56a and cf23a in Duchenne muscular dystrophy. *American Journal of Medical Genetics*. **39**, 437–441.
- Rapaport D., Passos-Bueno M. R., Takata R. I., Campioto S., Eggers S., Vainzof M., Makover A., Nudel U., Yaffe D. and Zatz M. (1992). A deletion including the brain promoter of the Duchenne muscular dystrophy gene is not associated with mental retardation. *Neuromuscular Disorders*. **2**, 117–120.
- Rasic M. V., Vojinovic D., Pesovic J., Mijalkovic G., Lukic V., Mladenovic J., Kosac a., Novakovic I., Maksimovic N., Romac S., *et al.* (2014). Intellectual Ability in the Duchenne Muscular Dystrophy and Dystrophin Gene Mutation Location. *Balkan Journal of Medical Genetics*. **17**, 25–35.
- Reissner C., Runkel F. and Missler M. (2013). Neurexins. *Genome Biology*. **14**,.
- Repovš G. and Baddeley A. (2006). The multi-component model of working memory: Explorations in experimental cognitive psychology. *Neuroscience*. **139**, 5–21.
- Riaza Bermudo-Soriano C., Perez-Rodriguez M. M., Vaquero-Lorenzo C. and Baca-Garcia E. (2012). New perspectives in glutamate and anxiety. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. **100**, 752–774.
- Ribeiro M. J., Violante I. R., Bernardino I., Edden R. A. E. and Castelo-Branco M. (2015). Abnormal relationship between GABA, neurophysiology and impulsive behavior in neurofibromatosis type 1. *Cortex*. **64**, 194–208.

- Ricotti V., Jäggle H., Theodorou M., Moore A. T., Muntoni F. and Thompson D. a (2015). Ocular and neurodevelopmental features of Duchenne muscular dystrophy: a signature of dystrophin function in the central nervous system. *European Journal of Human Genetics*. 1–7.
- Ricotti V., Mandy W. P. L., Scoto M., Pane M., Deconinck N., Messina S., Mercuri E., Skuse D. H. and Muntoni F. (2016). Neurodevelopmental, emotional, and behavioural problems in Duchenne muscular dystrophy in relation to underlying dystrophin gene mutations. *Developmental Medicine and Child Neurology*. **58**, 77–84.
- Ricotti V., Ridout D. A. and Muntoni F. (2013). Steroids in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*. **23**, 696–7.
- Roberts R. G., Bobrow M. and Bentley D. R. (1992). Point mutations in the dystrophin gene. *PNAS*. **89**, 2331–2335.
- Roccella M., Pace R. and De Gregorio M. T. (2003). Psychopathological assessment in children affected by Duchenne de Boulogne muscular dystrophy. *Minerva Pediatrica*. **55**, 267–273, 273–276.
- Rodrigues M. R., Carvalho C. R. F., Santaella D. F., Lorenzi-Filho G. and Nagahashi M. S. K. (2009). Effects of yoga breathing exercises on pulmonary function in patients with Duchenne muscular dystrophy: an exploratory analysis. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. **35**, 949–956.
- Romo-Yáñez J., Montañez C. and Salazar-Olivo L. A. (2011). Dystrophins and DAPs are expressed in adipose tissue and are regulated by adipogenesis and extracellular matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **404**, 717–722.
- Rosen J. B. (2004). The neurobiology of conditioned and unconditioned fear: a neurobehavioral system analysis of the amygdala. *Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews*. **3**, 23–41.
- Rutter M. M., Collins J., Rose S. R., Woo J. G., Sucharew H., Sawnani H., Hor K. N., Cripe L. H. and Wong B. L. (2012). Growth hormone treatment in boys with Duchenne muscular dystrophy and glucocorticoid-induced growth failure. *Neuromuscular Disorders*. **22**, 1046–56.
- Ryder-Cook A. S., Sicinski P., Thomas K., Davies K. E., Worton R. G., Barnard E. A., Darlison M. G. and Barnard P. J. (1988). Localization of the mdx mutation within the mouse dystrophin gene. *The EMBO Journal*. **7**, 3017–3021.
- Sacchetti B., Scelfo B. and Strata P. (2009). Cerebellum and emotional behavior. *Neuroscience*. **162**, 756–762.
- Saint Martín A., Aragón J., Depardon-Benítez F., Sánchez-Trujillo A., Mendoza-Hernández G., Ceja V. and Montañez C. (2012). Identification of Dp71e, a new dystrophin with a novel carboxy-terminal end. *The FEBS Journal*. **279**, 66–77.
- Sarig R., Mezger-Lallemant V., Gitelman I., Davis C., Fuchs O., Yaffe D. and Nudel U. (1999). Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: differential activity of the Dp71 promoter during development. *Human Molecular Genetics*. **8**, 1–10.
- Sbriccoli A., Santarelli M., Carretta D., Pinto F., Granato A. and Minciacchi D. (1995). Architectural changes of the cortico-spinal system in the dystrophin defective mdx mouse. *Neuroscience Letters*. **200**, 53–6.
- Scott K. L., Nogueira C., Heffernan T. P., van Doorn R., Dhakal S., Hanna J. A., Min C., Jaskelioff M., Xiao Y., Wu C.-J., et al. (2011). Proinvasion metastasis drivers in early-stage melanoma are oncogenes. *Cancer Cell*. **20**, 92–103.
- Sekiguchi M., Zushida K., Yoshida M., Maekawa M., Kamichi S., Yoshida M., Sahara Y., Yuasa S., Takeda S. 'ichi and Wada K. (2009). A deficit of brain dystrophin impairs specific amygdala GABAergic transmission and enhances defensive behaviour in mice. *Brain*. **132**, 124–135.
- Sene A., Tadayoni R., Pannicke T., Wurm A., El Mathari B., Benard R., Roux M. J., Yaffe D., Mornet D., Reichenbach A., et al. (2009). Functional Implication of Dp71 in Osmoregulation and Vascular Permeability of the Retina. *PLoS ONE*. **4**, e7329.
- Sesay A. K., Errington M. L. and Levita L. (1996). Spatial learning and hippocampal long-term potentiation are not impaired in mdx mice. *Neuroscience Letters*. **211**, 207–210.
- Sicinski P., Geng Y., Ryder-Cook A. S., Barnard E. A., Darlison M. G. and Barnard P. J. (1989). The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*. **244**, 1578–1580.
- Simonds A. K., Muntoni F., Heather S. and Fielding S. (1998). Impact of nasal ventilation on survival in hypercapnic Duchenne muscular dystrophy. *Thorax*. **53**, 949–52.
- Smalheiser N. R. and Schwartz N. B. (1987). Cranin: a laminin-binding protein of cell membranes. *PNAS*. **84**, 6457–61.
- Sollee N. D., Latham E. E., Kindlon D. J. and Bresnan M. J. (1985). Neuropsychological impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*. **7**, 486–96.

- Stedman H. H., Sweeney H. L., Shrager J. B., Maguire H. C., Panettieri R. A., Petrof B., Narusawa M., Lefterovich J. M., Sladky J. T. and Kelly A. M. (1991). The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature*. **352**, 536–9.
- Suzuki Y., Higuchi S., Aida I., Nakajima T. and Nakada T. (2016). Abnormal Distribution of GABAA Receptors in Brain of Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *Muscle & Nerve*.
- Tan J., Tan S., Zheng H., Liu M., Chen G., Zhang H., Wang K., Tan S., Zhou J. and Xiao X. (2015). HSF1 functions as a transcription regulator for Dp71 expression. *Cell Stress & Chaperones*. **20**, 371–379.
- Taylor P. J., Betts G. A., Maroulis S., Gilissen C., Pedersen R. L., Mowat D. R., Johnston H. M. and Buckley M. F. (2010). Dystrophin gene mutation location and the risk of cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One*. **5**, e8803.
- Theadom A., Rodrigues M., Roxburgh R., Balalla S., Higgins C., Bhattacharjee R., Jones K., Krishnamurthi R. and Feigin V. (2014). Prevalence of Muscular Dystrophies: A Systematic Literature Review. *Neuroepidemiology*. **43**, 259–268.
- Tinsley J. M., Blake D. J. and Davies K. E. (1993). Apo-dystrophin-3: a 2.2kb transcript from the DMD locus encoding the dystrophin glycoprotein binding site. *Human Molecular Genetics*. **2**, 521–524.
- Tokarz S. A., Duncan N. M., Rash S. M., Sadeghi A., Dewan A. K. and Pillers D. A. (1998). Redefinition of dystrophin isoform distribution in mouse tissue by RT-PCR implies role in nonmuscle manifestations of duchenne muscular dystrophy. *Molecular Genetics and Metabolism*. **65**, 272–81.
- Tozawa T., Itoh K., Yaoi T., Tando S., Umekage M., Dai H., Hosoi H. and Fushiki S. (2012). The shortest isoform of dystrophin (Dp40) interacts with a group of presynaptic proteins to form a presumptive novel complex in the mouse brain. *Molecular Neurobiology*. **45**, 287–297.
- Tuffery S., Lenk U., Roberts R. G., Coubes C., Demaille J. and Claustres M. (1995). Protein truncation test: analysis of two novel point mutations at the carboxy-terminus of the human dystrophin gene associated with mental retardation. *Human Mutation*. **6**, 126–135.
- Vacca O., Charles-Messance H., El Mathari B., Sene A., Barbe P., Fouquet S., Aragón J., Darche M., Giocanti-Aurégan A., Paques M., *et al.* (2016). AAV-mediated gene therapy in Dystrophin-Dp71 deficient mouse leads to blood-retinal barrier restoration and edema reabsorption. *Human Molecular Genetics*.
- Vacca O., Darche M., Schaffer D. V., Flannery J. G., Sahel J. A., Rendon A. and Dalkara D. (2014). AAV-mediated gene delivery in Dp71-null mouse model with compromised barriers. *Glia*. **62**, 468–476.
- Vaillend C., Billard J. M., Claudepierre T., Rendon A., Dutar P. and Ungerer A. (1998). Spatial discrimination learning and CA1 hippocampal synaptic plasticity in mdx and mdx3cv mice lacking dystrophin gene products. *Neuroscience*. **86**, 53–66.
- Vaillend C., Billard J. M. and Laroche S. (2004). Impaired long-term spatial and recognition memory and enhanced CA1 hippocampal LTP in the dystrophin-deficient Dmdmdx mouse. *Neurobiology of Disease*. **17**, 10–20.
- Vaillend C. and Billard J.-M. (2002). Facilitated CA1 hippocampal synaptic plasticity in dystrophin-deficient mice: role for GABAA receptors? *Hippocampus*. **12**, 713–717.
- Vaillend C. and Chausseot R. (2017). Relationships linking emotional, motor, cognitive and GABAergic dysfunctions in dystrophin-deficient mdx mice. *Human Molecular Genetics*.
- Vaillend C., Perronnet C., Ros C., Gruszczynski C., Goyenvallé A., Laroche S., Danos O., Garcia L. and Peltekian E. (2010). Rescue of a dystrophin-like protein by exon skipping in vivo restores GABAA-receptor clustering in the hippocampus of the mdx mouse. *Molecular Therapy*. **18**, 1683–1688.
- Vaillend C., Rendon A., Misslin R. and Ungerer A. (1995). Influence of dystrophin-gene mutation on mdx mouse behavior. I. Retention deficits at long delays in spontaneous alternation and bar-pressing tasks. *Behavior Genetics*. **25**, 569–79.
- Vaillend C. and Ungerer A. (1999). Behavioral characterization of mdx3cv mice deficient in C-terminal dystrophins. *Neuromuscular Disorders*. **9**, 296–304.
- Vaillend C., Ungerer A. and Billard J. M. (1999). Facilitated NMDA receptor-mediated synaptic plasticity in the hippocampal CA1 area of dystrophin-deficient mice. *Synapse*. **33**, 59–70.
- Van Ruiten H. J. A., Marini Bettolo C., Cheetham T., Eagle M., Lochmuller H., Straub V., Bushby K. and Guglieri M. (2016). Why are some patients with Duchenne muscular dystrophy dying young: An analysis of causes of death in North East England. *European Journal of Paediatric Neurology*.
- Villarreal-Silva M., Centeno-Cruz F., Suárez-Sánchez R., Garrido E. and Cisneros B. (2011). Knockdown of dystrophin Dp71 impairs PC12 cells cycle: localization in the spindle and cytokinesis structures implies a role for Dp71 in cell division. *PLoS One*. **6**, e23504.

- Vojinovic D., Adams H. H., van der Lee S. J., Ibrahim-Verbaas C. a, Brouwer R., van den Hout M. C., Oole E., van Rooij J., Uitterlinden A., Hofman A., *et al.* (2014). The dystrophin gene and cognitive function in the general population. *European Journal of Human Genetics*. **23**, 837–843.
- Waite A., Brown S. C. and Blake D. J. (2012). The dystrophin-glycoprotein complex in brain development and disease. *Trends in Neurosciences*. **35**, 487–496.
- Waite A. J., Carlisle F. A., Chan Y. M. and Blake D. J. (2016). Myoclonus dystonia and muscular dystrophy: ϵ -sarcoglycan is part of the dystrophin-associated protein complex in brain. *Movement Disorders*.
- Waite A., Tinsley C. L., Locke M. and Blake D. J. (2009). The neurobiology of the dystrophin-associated glycoprotein complex. *Annals of Medicine*. **41**, 344–59.
- Wallis T., Bubbs W. A., McQuillan J. A., Balcar V. J. and Rae C. (2004). For want of a nail. ramifications of a single gene deletion, dystrophin, in the brain of the mouse. *Frontiers in Bioscience*. **9**, 74–84.
- Wein N., Alfano L. and Flanigan K. M. (2015). Genetics and Emerging Treatments for Duchenne and Becker Muscular Dystrophy. *Pediatric Clinics of North America*. **62**, 723–742.
- Wersinger E., Bordais A., Schwab Y., Sene A., Bénard R., Alunni V., Sahel J.-A., Rendon A. and Roux M. J. (2011). Reevaluation of Dystrophin Localization in the Mouse Retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **52**, 7901.
- Wheeler M. T., Zarnegar S. and McNally E. M. (2002). Zeta-sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*. **11**, 2147–2154.
- Whewy J. M. and Roberts R. G. (2003). The dystrophin lymphocyte promoter revisited: 4.5-megabase intron, or artifact? *Neuromuscular Disorders*. **13**, 17–20.
- Wicksell R. K., Kihlgren M., Melin L. and Eeg-Olofsson O. (2004). Specific cognitive deficits are common in children with Duchenne muscular dystrophy. *Developmental Medicine and Child Neurology*. **46**, 154–159.
- Williamson R. A., Henry M. D., Daniels K. J., Hrstka R. F., Lee J. C., Sunada Y., Ibraghimov-Beskrovnaya O. and Campbell K. P. (1997). Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in Dag1-null mice. *Human Molecular Genetics*. **6**, 831–41.
- Willott J. F. (2006). Measurement of the auditory brainstem response (ABR) to study auditory sensitivity in mice. *Current Protocols in Neuroscience*. **Chapter 8**, Unit8.21B.
- Wingeier K., Giger E., Strozzi S., Kreis R., Joncourt F., Conrad B., Gallati S. and Steinlin M. (2011). Neuropsychological impairments and the impact of dystrophin mutations on general cognitive functioning of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Clinical Neuroscience*. **18**, 90–95.
- Wu J. Y., Kuban K. C. K., Allred E., Shapiro F. and Darras B. T. (2005). Association of Duchenne muscular dystrophy with autism spectrum disorder. *Journal of Child Neurology*. **20**, 790–795.
- Xu L., Park K. H., Zhao L., Xu J., El Refaey M., Gao Y., Zhu H., Ma J. and Han R. (2016). CRISPR-mediated Genome Editing Restores Dystrophin Expression and Function in mdx Mice. *Molecular Therapy*. **24**, 564–569.
- Yamaguchi M. and Suzuki M. (2015). Becoming a back-up carer: Parenting sons with Duchenne muscular dystrophy transitioning into adulthood. *Neuromuscular Disorders*. **25**, 85–93.
- Yamakawa H., Oyama S., Mitsunashi H., Sasagawa N., Uchino S., Kohsaka S. and Ishiura S. (2007). Neuroligins 3 and 4X interact with syntrophin-gamma2, and the interactions are affected by autism-related mutations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **355**, 41–46.
- Yamamoto K., Yamada D., Kabuta T., Takahashi A., Wada K. and Sekiguchi M. (2010). Reduction of abnormal behavioral response to brief restraint by information from other mice in dystrophin-deficient mdx mice. *Neuromuscular Disorders*. **20**, 505–511.
- Yoshihara Y., Onodera H., Iinuma K. and Itoyama Y. (2003). Abnormal kainic acid receptor density and reduced seizure susceptibility in dystrophin-deficient mdx mice. *Neuroscience*. **117**, 391–395.
- Young H. K., Barton B. a, Waisbren S., Portales Dale L., Ryan M. M., Webster R. I. and North K. N. (2008). Cognitive and psychological profile of males with Becker muscular dystrophy. *Journal of Child Neurology*. **23**, 155–162.
- Zatz M. and Pavanello R. C. M. (2013). Steroids in Duchenne dystrophy. *Neuromuscular Disorders*. **23**, 952–3.
- Zhou D., Wang J., Zapala M. A., Xue J., Schork N. J. and Haddad G. G. (2008). Gene expression in mouse brain following chronic hypoxia: role of sarcospan in glial cell death. *Physiological Genomics*. **32**, 370–379.

Résumés et mots clefs

1. Résumé de la thèse en français

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est un syndrome neuromusculaire dû à des mutations dans le gène *dmd* qui conduisent à la perte d'expression des dystrophines, protéines normalement exprimée dans différents tissus y compris le cerveau. Le profil cognitif des patients est hétérogène et la présence d'une déficience intellectuelle dépend de la position des mutations dans le gène. Cette variabilité s'explique par la complexité du gène *dmd* qui comprend plusieurs promoteurs internes permettant l'expression cérébrale de plusieurs dystrophines de tailles différentes. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à deux dystrophines : la dystrophine complète (Dp427), normalement exprimée dans le muscle et le cerveau et absente chez tous les patients DMD, et la forme la plus courte de dystrophine, la Dp71, produit cérébral majeur du gène *dmd* absente dans un sous-groupe de patients. Ces deux dystrophines ont des fonctions cellulaires différentes : La Dp427, normalement exprimée dans les synapses inhibitrices en interaction avec les récepteurs du GABA, joue un rôle dans la plasticité synaptique, l'apprentissage et la mémoire. Sa perte conduit à des déficits cognitifs modérés. La Dp71, majoritairement exprimée dans les astrocytes périvasculaires, contribue à l'ancrage de canaux ioniques impliqués dans l'homéostasie cérébrale et joue aussi un rôle dans la synapse glutamatergique. La perte de Dp71 aggrave fortement les déficits associés à la perte de Dp427 chez les patients et conduit à une déficience intellectuelle sévère. Les relations génotypes-phénotypes restent à préciser et on suppose qu'au-delà de la sévérité des déficits, la nature même des altérations cognitives, ainsi que que la présence de troubles sensoriels, cognitifs, exécutifs et neuropsychiatriques, dépendent des formes de dystrophines touchées. Pour étudier le rôle de ces deux dystrophines, nous avons utilisé deux modèles murins : la souris *mdx* uniquement déficiente en Dp427, et la souris Dp71-null uniquement déficiente en Dp71. Une étude comportementale à large spectre nous a permis de mieux caractériser le phénotype associé à la perte de Dp427 et de Dp71, en précisant l'intégrité de la perception et du traitement des stimuli sensoriels auditifs, des réponses émotionnelles et de la réactivité au stress, des performances d'apprentissage, ainsi que de certaines composantes des fonctions exécutives, comme la mémoire de travail spatiale et la flexibilité comportementale. Ce travail a été complété par des études collaboratives visant à caractériser le rôle de la Dp71 dans la plasticité corticale et à développer une approche de thérapie génique pour restaurer la fonction de la Dp427 chez la souris *mdx*. Nous montrons que la perte de Dp427 perturbe les fonctions GABAergiques, les réponses émotionnelles induites par un stress ainsi que la mémoire émotionnelle et la mémoire à long terme, sans altération majeure des fonctions sensorielles et exécutives. Nous montrons aussi qu'une thérapie génique basée sur des injections systémiques d'oligonucléotides antisens, porteurs de chimies spécifiques et passant la barrière hémato-encéphalique, est capable de restaurer une Dp427 fonctionnelle par la technique du saut d'exon et de compenser les altérations émotionnelles des souris *mdx*. La perte de Dp71 a un impact différent : Elle altère la balance excitation/inhibition et la plasticité synaptique corticale et perturbe l'apprentissage, la flexibilité comportementale et la mémoire de travail dans des tâches d'apprentissage spatial. Notre étude de ces modèles murins a donc permis de clarifier les relations génotype-phénotype et les bases neurobiologiques de cette maladie, et d'identifier des phénotypes utiles pour valider l'efficacité de traitements ciblant le cerveau dans des études précliniques.

2. Résumé de la thèse en anglais

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a neuromuscular syndrome caused by mutations in the *dmd* gene, leading to the loss of dystrophin proteins, which are normally expressed in various tissues including the brain. Patients exhibit heterogeneous cognitive profiles and the presence of intellectual disability depends on the location of the mutation within the gene. This variability can be explained by the complexity of the *dmd* gene, which includes several internal promoters leading to the cerebral expression of several dystrophins of different sizes. In this thesis work, we focused on two dystrophins : the full-length dystrophin (Dp427) normally expressed in muscle and brain and lost by all DMD patients, and the shortest dystrophin, Dp71, major cerebral product of the *dmd* gene that is absent in a subgroup of patients. These two dystrophins have distinct cellular functions : Dp427, normally interacting with GABA receptors in inhibitory synapses, plays a role in synaptic plasticity, learning and memory. Its loss leads to mild cognitive deficits. Dp71, mostly expressed in perivascular astrocytes, contributes to the anchoring of ionic channels involved in brain homeostasis and also plays a role in glutamatergic synapses. Dp71 loss strongly aggravates the deficits associated with the loss of Dp427 in patients and lead to severe intellectual disability. Genotype-phenotype relationships need be further specified and it is assumed that beyond deficits severity, the actual nature of cognitive alterations, as well as the presence of sensorial, cognitive, executive and neuropsychiatric disturbances, depend on the specific forms of dystrophin affected by mutations. To study the role of these two dystrophins, we used two mouse models : the *mdx* mouse that only lacks Dp427, and the Dp71-null mouse that only lacks Dp71. An extensive behavioral study allowed us to better characterize the phenotype associated with the loss of Dp427 and Dp71, detailing integrity of perception and processing of auditory sensory stimuli, of emotional responses and stress reactivity, of learning performance, and of components of executive functions, such like spatial working memory and behavioral flexibility. The work has been completed by collaborative studies aimed at characterizing the role of Dp71 in cortical plasticity and at developing gene therapy approaches to rescue Dp427 function in the *mdx* mouse. We demonstrate that Dp427 loss perturbs GABAergic functions, stress-induced emotional responses, as well as emotional and long-term memories, without major alterations of sensory and executive functions. We also show that a gene therapy based on systemic injections of antisense oligonucleotides holding specific chemistries and crossing the blood-brain barrier enables Dp427 functional rescue by exon-skipping strategy and alleviates emotional disturbances in *mdx* mice. The loss of Dp71 has a distinct impact : It alters cortical excitation/inhibition balance and plasticity and disrupt learning, behavioral flexibility and working memory in spatial learning tasks. Our study of these mouse models therefore enabled to clarify the genotype-phenotype relationships and neurobiological bases of this disease, and identified valuable phenotypes to validate treatment efficacy in future brain-targeting preclinical studies.

3. Résumé de thèse vulgarisé pour le grand public en français

La myopathie de Duchenne est un syndrome neuromusculaire causé par la perte de protéines normalement exprimées dans le cerveau et le muscle : les dystrophines. En plus de la myopathie, les patients présentent des altérations sensorielles, émotionnelles, cognitives et neuropsychiatriques qui sont variables en fonction de la position des mutations dans le gène *dmd*, qui peuvent affecter différentes formes de dystrophine cérébrale. Notre étude comportementale chez deux modèles de souris porteuses de mutations différentes a permis de préciser la nature et la sévérité des dysfonctionnements cognitifs associés à cette maladie, en fonction de la forme (neuronale ou gliale) de dystrophine touchée. Nous avons mis en évidence des altérations spécifiques à ces deux modèles, et nous les discutons à la lumière des données cliniques recueillies chez les patients. Nos résultats suggèrent qu'une partie des altérations cérébrales de cette maladie peuvent être corrigées par thérapie génique.

4. Résumé de thèse vulgarisé pour le grand public en anglais

Duchenne muscular dystrophy is a neuromuscular syndrome caused by the loss of proteins that are normally expressed in both brain and muscle : the dystrophins. In addition to myopathy, patients display sensorial, emotional, cognitive and neuropsychiatric disturbances, at variable degrees depending on the location of the mutation within the *dmd* gene, which may affect distinct forms of brain dystrophins. Our behavioral study in two mouse models carrying distinct mutations allowed us to clarify the nature and severity of the cognitive dysfunctions associated with this disease, depending on the type of dystrophin (neuronal or glial) affected by mutations. We evidenced specific alterations in these two models, which we discuss in light of current clinical data. Our results suggest that part of the brain alterations in this disease could be corrected by means of gene therapy.

5. Mots clés en français

- | | |
|-------------------------------|------------------------------|
| 1 - dystrophine | 4 - émotions |
| 2 - déficience intellectuelle | 5 - apprentissage associatif |
| 3 - fonctions exécutives | 6 - thérapie génique |

6. Mots clés en Anglais

- | | |
|-----------------------------|--------------------------|
| 1 - dystrophin | 4 - emotions |
| 2 - intellectual disability | 5 - associative learning |
| 3 - executive functions | 6 - gene therapy |

Avec le temps, tous les souvenirs sont bons.

Titre : Neurobiologie des troubles cognitifs des modèles murins de la myopathie de Duchenne

Mots clés : dystrophine, déficience intellectuelle, fonctions exécutives, émotions, apprentissage associatif, thérapie génique

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est un syndrome neuromusculaire dû à des mutations dans le gène *dmd* qui conduisent à la perte d'expression des dystrophines, protéines normalement exprimée dans différents tissus y compris le cerveau. Le profil cognitif des patients est hétérogène et la présence d'une déficience intellectuelle dépend de la position des mutations dans le gène. Cette variabilité s'explique par la complexité du gène *dmd* qui comprend plusieurs promoteurs internes permettant l'expression cérébrale de plusieurs dystrophines de tailles différentes. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à deux dystrophines : la dystrophine complète (Dp427), normalement exprimée dans le muscle et le cerveau et absente chez tous les patients DMD, et la forme la plus courte de dystrophine, la Dp71, produit cérébral majeur du gène *dmd* absente dans un sous-groupe de patients. Ces deux dystrophines ont des fonctions cellulaires différentes : La Dp427, normalement exprimée dans les synapses inhibitrices en interaction avec les récepteurs du GABA, joue un rôle dans la plasticité synaptique, l'apprentissage et la mémoire. Sa perte conduit à des déficits cognitifs modérés. La Dp71, majoritairement exprimée dans les astrocytes périvasculaires, contribue à l'ancrage de canaux ioniques impliqués dans l'homéostasie cérébrale et joue aussi un rôle dans la synapse glutamatergique. La perte de Dp71 aggrave fortement les déficits associés à la perte de Dp427 chez les patients et conduit à une déficience intellectuelle sévère. Les relations génotypes-phénotypes restent à préciser et on suppose qu'au-delà de la sévérité des déficits, la nature même des altérations cognitives, ainsi que que la présence de troubles sensoriels, cognitifs, exécutifs et neuropsychiatriques, dépendent des formes de dystrophines touchées. Pour étudier le rôle de ces deux dystrophines, nous avons utilisé deux modèles murins : la souris *mdx* uniquement déficiente en Dp427, et la souris Dp71-null uniquement déficiente en Dp71. Une étude comportementale à large spectre nous a permis de mieux caractériser le phénotype associé à la perte de Dp427 et de Dp71, en précisant l'intégrité de la perception et du traitement des stimuli sensoriels auditifs, des réponses émotionnelles et de la réactivité au stress, des performances d'apprentissage, ainsi que de certaines composantes des fonctions exécutives, comme la mémoire de travail spatiale et la flexibilité comportementale. Ce travail a été complété par des études collaboratives visant à caractériser le rôle de la Dp71 dans la plasticité corticale et à développer une approche de thérapie génique pour restaurer la fonction de la Dp427 chez la souris *mdx*. Nous montrons que la perte de Dp427 perturbe les fonctions GABAergiques, les réponses émotionnelles induites par un stress ainsi que la mémoire émotionnelle et la mémoire à long terme, sans altération majeure des fonctions sensorielles et exécutives. Nous montrons aussi qu'une thérapie génique basée sur des injections systémiques d'oligonucléotides antisens, porteurs de chimies spécifiques et passant la barrière hémato-encéphalique, est capable de restaurer une Dp427 fonctionnelle par la technique du saut d'exon et de compenser les altérations émotionnelles des souris *mdx*. La perte de Dp71 a un impact différent : Elle altère la balance excitation/inhibition et la plasticité synaptique corticale et perturbe l'apprentissage, la flexibilité comportementale et la mémoire de travail dans des tâches d'apprentissage spatial. Notre étude de ces modèles murins a donc permis de clarifier les relations génotype-phénotype et les bases neurobiologiques de cette maladie, et d'identifier des phénotypes utiles pour valider l'efficacité de traitements ciblant le cerveau dans des études précliniques.

Title : Neurobiology of cognitive deficits in murine models of Duchenne muscular dystrophy

Keywords: dystrophin, intellectual disability, executive functions, emotions, associative learning, gene therapy

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a neuromuscular syndrome caused by mutations in the *dmd* gene, leading to the loss of dystrophin proteins, which are normally expressed in various tissues including the brain. Patients exhibit heterogenous cognitive profiles and the presence of intellectual disability depends on the location of the mutation within the gene. This variability can be explained by the complexity of the *dmd* gene, which includes several internal promoters leading to the cerebral expression of several dystrophins of different sizes. In this thesis work, we focused on two dystrophins : the full-length dystrophin (Dp427) normally expressed in muscle and brain and lost by all DMD patients, and the shortest dystrophin, Dp71, major cerebral product of the *dmd* gene that is absent in a subgroup of patients. These two dystrophins have distinct cellular functions : Dp427, normally interacting with GABA receptors in inhibitory synapses, plays a role in synaptic plasticity, learning and memory. Its loss leads to mild cognitive deficits. Dp71, mostly expressed in perivascular astrocytes, contributes to the anchoring of ionic channels involved in brain homeostasis and also plays a role in glutamatergic synapses. Dp71 loss strongly aggravate the deficits associated with the loss of Dp427 in patients and lead to severe intellectual disability. Genotype-phenotype relationships need be further specified and it is assumed that beyond deficits severity, the actual nature of cognitive alterations, as well as the presence of sensorial, cognitive, executive and neuropsychiatric disturbances, depend on the specific forms of dystrophin affected by mutations. To study the role of these two dystrophins, we used two mouse models : the *mdx* mouse that only lacks Dp427, and the Dp71-null mouse that only lacks Dp71. A extensive behavioral study allowed us to better characterize the phenotype associated with the loss of Dp427 and Dp71, detailing integrity of perception and processing of auditory sensory stimuli, of emotional responses and stress reactivity, of learning performance, and of components of executive functions, such like spatial working memory and behavioral flexibility. The work has been completed by collaborative studies aimed at characterizing the role of Dp71 in cortical plasticity and at developing gene therapy approaches to rescue Dp427 function in the *mdx* mouse. We demonstrate that Dp427 loss perturbs GABAergic functions, stress-induced emotional responses, as well as emotional and long-term memories, without major alterations of sensory and executive functions. We also show that a gene therapy based on systemic injections of antisens oligonucleotides holding specific chemistries and crossing the blood-brain barrier enables Dp427 functional rescue by exon-skipping strategy and alleviates emotional disturbances in *mdx* mice. The loss of Dp71 has a distinct impact : It alters cortical excitation/inhibition balance and plasticity and disrupt learning, behavioral flexibility and working memory in spatial learning tasks. Our study of these mouse models therefore enabled to clarify the genotype-phenotype relationships and neurobiological bases of this disease, and identified valuable phenotypes to validate treatment efficacy in future brain-targeting preclinical studies.

