



**HAL**  
open science

# Caractérisation biophysique multi-échelle et temporelle d'un modèle murin préclinique dans le contexte de la Dystrophie musculaire de Duchenne

Nassim Anis Ahmine

► **To cite this version:**

Nassim Anis Ahmine. Caractérisation biophysique multi-échelle et temporelle d'un modèle murin préclinique dans le contexte de la Dystrophie musculaire de Duchenne. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne - Paris 12, 2023. Français. NNT : 2023PA120003 . tel-04861214

**HAL Id: tel-04861214**

**<https://theses.hal.science/tel-04861214v1>**

Submitted on 2 Jan 2025

**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.

**UNIVERSITÉ PARIS-EST**

Ecole doctorale SVS ED402 : Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse de doctorat

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

---

**Caractérisation biophysique multi-échelle et  
temporelle d'un modèle murin préclinique dans le  
contexte de la Dystrophie musculaire de Duchenne**

---

**Nassim Anis AHMINE**

Directeur de thèse : Professeur Frédéric RELAIX

Co-directrice : Sophie Féréol / Co-encadrant : Redouane FODIL

Jury de thèse

Prof. Frédéric RELAIX

Dr. Sophie FÉREOL

Dr. Redouane FODIL

Dr. Claude VERDIER

Dr. Myriam REFFAY

Prof. Patricia ALBANESE

Prof. Benoit LADOUX

Prof. Bruno ALLARD

Directeur de thèse

Co-Directrice

Co-encadrant

Rapporteur

Rapportrice

Examinatrice

Examinateur

Examinateur



Concernant le savoir :

*« La connaissance est un trésor mais c'est l'usage qui en est la clef. »*

*Ibn Khaldoun*

Concernant la thèse :

*« Nous ne pouvons, ni ne pourrons atteindre les sommets éclairés sans traverser les profondeurs obscures. »*

*Khalil Gibran*

Concernant la biologie et la physique :

*« Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre. »*

*Marie Curie*

***Aux miens.***



## Remerciements

Dans cette section, je voudrais remercier toute personne qui m'a aidé, encouragé et réconforté de près ou de loin durant mon parcours académique. Je ne pourrais sûrement pas citer tout le monde mais je voudrais insister sur le fait que je suis extrêmement reconnaissant envers toutes ces personnes que j'ai croisé sur mon chemin.

Tout d'abord, je voudrais commencer par remercier du fond du cœur mes deux encadrants, Redouane et Sophie, avec qui j'ai partagé tellement de choses durant ces 5 dernières années. Merci de m'avoir permis d'avoir la bourse grâce à laquelle j'ai pu poursuivre mes études en France. Merci de m'avoir accueilli pour mon stage de fin d'études puis ma thèse. Vous n'avez jamais abandonné devant tous les problèmes qu'on a pu rencontrer durant cette aventure. J'ai énormément appris de vous scientifiquement mais également humainement. Vous m'avez guidé, aidé, conseillé, soutenu et poussé à réfléchir tout au long de ce chemin. Merci d'avoir été là pour moi. Merci à Redouane pour tout le travail et les efforts que tu as faits, toutes les fois où tu es sorti tard à causes de nos manips, pour toutes les courbes que nous avons analysées, toutes les nuits que tu as veillé pour travailler sur notre projet et toutes les fois où tu me répondais à des heures étonnantes comme 3h du matin. Merci également pour tout ce que tu m'as appris et tous ces débats acharnés que nous avons eus pendant des heures. Merci pour tout. Merci à Sophie pour toute l'aide que tu m'as fourni, ton initiation aux bases de la biophysique, pour les journées manips où on ne s'arrêtait pas du matin au soir, pour toutes les fois où, toute seule, tu sentais que je n'allais pas bien et que tu demandais de mes nouvelles, tu me conseillais et me remontais le moral. Merci pour t'être démêlée pour que je passe cette thèse dans les meilleures conditions. A toi aussi, merci pour tout.

Je voudrais également remercier mon directeur de thèse, le Pr Frédéric Relaix, de m'avoir donné la chance de rejoindre son laboratoire et d'y poursuivre ma thèse. Merci aussi pour ton aide et soutien administratif et financier, notamment pour l'acquisition de l'AFM, outil indispensable à la réussite de cette thèse. Je n'ai vraiment manqué de rien. Merci également pour tes conseils scientifiques très pertinents qui ont aidé à tracer la direction de ce travail.

Je voudrais remercier madame Myriam Reffay et monsieur Claude Verdier pour avoir accepté d'être mes rapporteurs de thèse, d'avoir étudié en détails mon manuscrit de thèse et de m'avoir donné des remarques pertinentes qui m'ont aidé à approfondir ma réflexion concernant mes travaux. Ce fut très enrichissant.

Merci également aux professeurs Benoit Ladoux et Bruno Allard pour avoir accepté d'être les membres de mon comité de suivi de thèse puis mes examinateurs. Vos conseils durant nos réunions étaient très clairs et précis et m'ont énormément aidé dans la suite de mon travail. Merci également au professeur Patricia Albanèse pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Par la suite, je voudrais remercier mes amis. Sans vous, je ne sais pas comment j'aurais résisté à ces 4 années.

Tout d'abord, merci à Louai qui est l'une des plus belles découvertes de cette thèse. Avec toi, on a voyagé, on a rigolé, on s'est raconté nos problèmes, on a veillé jusqu'à pas d'heure au labo et tu as même pris soin de mes cellules à chaque fois que je m'absentais. Grâce à toi j'ai découvert ce qu'était le vrai café, merci d'ailleurs pour toutes ces tasses. Tu es quelqu'un de passionné dans ce que tu fais. Je te souhaite tout le bonheur du monde mon frère et sache que tu feras de grandes choses docteur Zaidan.

Merci à Maya et Ayoub d'exister dans ma vie. Ces deux meilleurs amis que j'ai rencontré en France mais qui me donnent l'impression de les avoir connu depuis toujours. Vous m'avez toujours compris et encouragé. Je me rappelle même avoir appelé Maya à 1h du matin en sortant de la salle de culture cellulaire totalement déprimé pour une manip qui n'a pas marché, et elle a été là avec les bons mots. Ayoub lui me disait toujours qu'il était fier de moi, m'appelait quand je n'étais pas bien sans même que je ne lui dise et ça me faisait tellement chaud au cœur. Merci les copains.

Merci à la team « east coast », Ferial, Racim et Redha pour avoir été là à chaque fois que j'avais besoin de me détendre et de rigoler. Merci pour toutes ces batailles de « chips<sup>x</sup> » et toutes ces soirées improvisées qui me rechargeaient la batterie à chaque fois. Sans oublier bien sur nos deux chatons préférés Ice (je ne t'aime toujours qu'un peu toi) et Tchikita (qui a le regard qui tue)

Merci à la team « Alger », Sissou, HichHich, Amine, Yazid, Aymen, Hassan, Riad et tous les autres pour tous vos encouragements et votre aide à chaque fois que j'en avais besoin et pour la moindre chose. Vous étiez toujours présents pour moi. Merci beaucoup et je vous souhaite toute la réussite les potos.

Merci également à mes amis présents en France et qui demandaient toujours de mes nouvelles, m'encourageaient et m'accueillaient chez eux, m'invitaient à sortir, à voyager, et qui

comprenaient quand je disais que je ne pouvais pas à cause de mes études... Je cite Bold qui est non-seulement l'une des personnes avec le plus bon fond que je connaisse mais également l'un des meilleurs artistes ! Merci à Ryadh, Mélissa, Idir, Chichi et Amine, Zaki, Daoud, Lydia, Maria, Ibtis, Sarra, Meziane, Riad, Lamine, Melissia et Lilia pour leurs soirées de malades et encouragement à chaque fois. Merci à Alice et Malek, Rawnak, Younes et Ilyes, à Ghiles et aux Brahimi (Kaci et Lyna) pour leur appui, leur soutien et leur bonne humeur. Je voudrais également remercier Djaber et Redouane pour tous leurs conseils sur la thèse et le message de persévérance et d'espoir qu'ils dégageaient. Merci les tiks.

Je voudrais également remercier les enseignants qui m'ont aidé à arriver ici tout au long de mon parcours académique. Je ne pourrais les citer tous mais j'évoquerais monsieur Guermache qui est non seulement un excellent professeur de physique/chimie mais aussi un magnifique voisin, monsieur Blidi pour sa passion pour l'algèbre qu'il partage si bien, monsieur Hellal pour sa compétence et sa rigueur qu'il essaye de transférer à ses élèves, monsieur Tahmi, mon directeur des études à l'ENP, qui n'a peut-être pas été mon professeur mais qui a sûrement changé ma vie à jamais et enfin madame Morini et monsieur Bournel qui m'ont donné l'opportunité de poursuivre mon master 2 et avec qui j'ai tellement appris scientifiquement, humainement et pédagogiquement.

Un grand merci à mes collègues qui n'ont eu de cesse de m'aider dès le premier jour. J'ai énormément appris grâce à vous, moi qui ne savais même pas tenir une pipette.

Merci à Reem, « The queen of cell culture » qui a été bien plus qu'une collègue, une amie. Tu m'as tous les jours encouragé et incité à travailler, tu m'as initié et suivi pendant de longues heures en culture cellulaire (encore désolé pour toutes les questions que je posais et tous les noooormal que je te lançais). Tu as su me rassurer et me calmer quand j'en avais besoin, merci encore queen.

Merci à Jean Loup, Sylvie, Nioosha, et maintenant Mohamed pour l'agréable ambiance au sein de notre bureau et mais également vos réponses à tous mes questionnements. Tous les débats qu'on a fait concernant la science mais également les sujets d'actualités ne m'ont fait que grandir.

Merci à Kaouthar et Valentina pour l'aide précieuse pour toutes les manip concernant les rats DMD, la dissection, vos réponses à mes questions et même votre aide à l'analyse des résultats.

Merci aux amis que je me suis fait au labo, à Juju qui m'as toujours soutenu et avec qui j'ai eu les meilleures pauses café avec toutes les barres qu'on s'est tapé. Merci à Mathilde pour son aide et sa disponibilité à chaque fois que j'en avais besoin, je suis vraiment reconnaissant. Merci à Farida qui a été un exemple de persévérance et qui était toujours là pour nous rendre le sourire, à notre grande et meilleure Dj, Dj Erica. Au bureau des doctorants avec Stemi, Perla, Cheryane, Sarah, Virgi, Oussama, Andrea et Joelle. Un merci également à Sultan, Raph, Maria, les deux Yasmine et Nastasia pour leur jovialité et soutien. Un grand merci à Médine et sa maman, Syrine et Jacquie pour la bonne ambiance dès le premier jour où elles ont rejoint l'IMRB ainsi que leur bonté. À Frédéric Auradé pour m'avoir formé au L2 mais surtout pour sa très bonne humeur tous les jours. À Anne Marie qui n'hésitait pas à donner savoir et anticorps à chaque fois que j'en ai eu besoin. À Péné et Clément avec qui j'ai partagé tellement de déjeunés au Crous et avec qui on partageait tous nos problèmes de thèse. À nos séniors à qui j'ai posé tellement de questions et qui ont toujours été là pour moi, Laurent, Phillippos, Joana, Eleni, Matt, Alessio, Ester et Max. Aux nouveaux Shayan et Janis et Marion. Aux différentes plateformes qui m'ont aidé et permis d'effectuer mes expériences, la plateforme d'imagerie, de FACS et l'animalerie, merci à Xavier, Adeline, Aurélie et Diana.

Je dirai également merci à ma grande famille. À ma grand-mère maternelle Nafissa que j'aime tellement, qui a une telle douceur dans l'âme et qui fait les meilleurs plats du monde, j'espère que tu auras une longue vie pleine de santé et de bonheur. À mes grand-parents décédés Tassaadit et Baba Lekhmissi, que je n'ai certes pas assez connu mais avec qui je garde de magnifiques souvenirs d'enfance. A mon grand-père paternel Baba Hamou décédé récemment et qui, par sa sagesse et sa douceur, m'a marqué à vie. Je me rappellerai toujours tous tes conseils grand-père et merci d'avoir été un exemple en tout. A ma tante Habiba qui a toujours été là pour toute la famille depuis que je la connais, quelqu'un qui n'hésite pas à donner. Je te souhaite un prompt rétablissement khalti. A mes oncles et tantes également et spécialement à tonton Nacer, tonton Fouad, sa femme tata Sabiha, et Khaled qui m'ont beaucoup aidé dès ma venue en France. À tonton Yacine Kharchi, tata Oulia qui ont été présents pour moi comme pour mes parents en mon absence. A ma belle-famille qui n'a jamais manqué une occasion pour demander après moi et à m'encourager (et qui ont mis au monde ma très chère Hindou qui plus est !). À tata Zahra et tonton Zinou pour leur bonne humeur quotidienne, leur bienveillance envers moi et Hind et pour avoir toujours été présents pour nous. Merci également à Rayane, le plus gentil des beaux-frères pour toutes les discussions seul à seul qu'on a eu et qui m'ont autant permis d'apprendre sur lui que sur moi. Merci à Amoura qui, j'en suis sûr, sera une aussi

merveilleuse personne que sa sœur. Enfin à El Deouadi pour toute sa bonne humeur, son humour, ses folies, ses voyages à la ferme à Bougie et ses appels à minuit quand je venais de rentrer du labo.

Je voudrais également dédier ce travail à un être très cher à mon cœur, un artiste complet, un garçon de ce qu'il y a de plus humain, et qui nous a quitté en plein milieu de ma thèse, mon ami et camarade Nadji, je ne t'oublierai pas. Paix à ton âme.

Un grand merci à mon beau-frère Ali qui a toujours le mot pour te faire rire et qui te fait bien comprendre que rien n'est fatalité. Merci Alilou. Merci également à la famille de Ali, Mani, tata Nacera, Imene, tonton Saleh et tous les autres pour leur soutien, leurs encouragements et leur bienveillance.

A mes nièces Rita et Maya que j'aime tant et qui sont un vrai soleil dans ma vie. Vous serez toujours les princesses à votre tonton et je suis sûr que vous serez des femmes aussi fortes que votre maman (même si elle a mis la barre haute) et que vous réussirez de grands exploits. Je vous aime tellement les totos.

Merci à mon cousin, ou plutôt mon frère Ghanou, qui a toujours assuré et qui a tout fait pour moi. Je ne finissais pas ma demande que déjà il enfilait ses chaussures pour aller me chercher ce que je voulais. Il n'a jamais hésité une seconde à m'aider ni à aider ma famille en mon absence. Je n'oublierai jamais tout l'appui physique et morale que tu m'as fourni.

A mon Algérie et son peuple. Une patrie qui, à chaque fois que je la quitte, me fait sentir pleins d'émotions différentes, positives et négatives, un mélange de tristesse, de nostalgie et d'accalmie. Une patrie meurtrie, qui fait de la peine mais qui te donne de l'espoir, dynamique mais désordonnée, belle mais négligente. Je ne peux que te souhaiter un avenir rayonnant et sache qu'on sera toujours là pour toi.

Pour finir, je voudrais remercier ma petite famille. Ma femme Hind, mes parents et ma sœur.

Hind, je voulais que tu saches que je suis conscient que cette thèse t'a été très éprouvante. Non seulement nous ne nous sommes pas vus pendant 2 ans, mais même quand tu es venu t'installer auprès de moi, ça m'arrivait très souvent d'être absent, de ne rentrer que tard le soir, 1h, 2h du matin... On ne pouvait même pas vivre notre vie de couple, sortir au cinéma, faire un pic-nic, regarder la télé ensemble, presque à chaque fois c'était la même réponse, désolé j'ai du travail... Je suis conscient également de tout le soutien physique et moral que tu m'as donné alors que toi-même tu étais à bout... et parfois même à cause de moi. Je t'ai même trop étouffé avec mon

stresse et je sais que ça n'a pas été évident pour toi ces 2 dernières années. Il t'arrivait de rentrer de ton job étudiant, d'appeler mes amis, de faire à manger pour tout le monde et je n'avais qu'à venir me reposer et profiter alors que tu tombais directement de sommeil et de fatigue. Merci beaucoup d'avoir été là et d'être là, toujours à mes côtés. Je n'aurais sûrement pas pu y arriver sans toi. Je t'aime. Je t'aime et j'espère que la fin de cette thèse sera le début de quelque chose d'encore plus beau, MPP.

A mes parents, merci. Merci d'avoir combattu toute votre vie pour nous fournir tout ce dont on avait besoin, que ce soient du côté matériel ou sentimental, vous étiez toujours là. Merci pour toutes les fois où vous avez même risqué votre vie pour nous. Tout ce que je suis aujourd'hui, je le dois en grande partie à vous. Merci d'avoir été un exemple à suivre. Merci maman pour toutes les fois, jour et nuit, où tu t'es assurée que je ne manquais de rien, toutes les fois où tu faisais en sorte que je mange bien et que je dors bien, tout l'amour que tu m'as donné, tous les enseignements que tu m'as fournis que ce soit à la maison ou au lycée. Merci pour ta bonté de cœur et pour tout maman chérie. Merci papa de toujours m'écouter quand je parle, de m'avoir initié à l'art du débat, de la discussion, de la rationalité, de la nuance et du compromis. De m'avoir appris le sens de la responsabilité, de l'empathie, de la justice et de l'humanisme. Merci d'avoir montré l'exemple en restant lié à tes principes, malgré toutes les offres que tu as eues et qui auraient pu changer ta vie. Merci pour tout Pa. Je vous aime.

A ma sœur, je ne sais pas comment je pourrais te remercier ni ce que je pourrais te dire. T'avoir comme grande sœur a été une vraie bénédiction. Tu as toujours été là pour moi, tu as subi, tu t'es donné à fond pour moi, tu as été ma confidente et tu m'as toujours protégé. Tu as donné de ton énergie, de ton temps, de ton argent, de tout, et ça avec toute la famille. Depuis tout petit, j'ai vraiment admiré ta force et ta ténacité dans toutes les épreuves que tu as pu rencontrer. Et si aujourd'hui j'en suis là, c'est aussi et très grande partie grâce à toi. Je t'aime sista.

## Résumé

La mécanique et la biologie sont étroitement liées, bien que les détails de leur interaction restent encore à clarifier. La cellule, unité fondamentale de la biologie, présente des propriétés mécaniques déterminées par son cytosquelette. Les caractéristiques mécaniques des matériaux biologiques sont fortement liées à leur état de santé. De nombreuses études ont montré un lien entre la structure interne de ces matériaux, leurs propriétés mécaniques, et leur état de santé. La complexité s'accroît avec la structure multi-échelle de certains matériaux biologiques, comme c'est le cas dans le muscle.

Dans notre étude, nous nous sommes concentrés sur la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) comme maladie musculaire. Nous avons analysé l'effet de cette maladie sur les propriétés mécaniques du muscle (comme la rigidité et la viscoélasticité) en utilisant un modèle de rat, R-DMDdel52, créé dans notre laboratoire. Ce modèle reproduit de manière précise et progressive le phénotype de la maladie humaine, démontrant ainsi sa pertinence.

Pour analyser l'impact de la DMD sur les propriétés mécaniques du muscle, nous avons utilisé diverses techniques comme la Microscopie à Force Atomique (AFM) et l'élastographie par ultrasons (UE). Des mesures ont été effectuées à différentes échelles biologiques : myoblaste, myotube, fibre musculaire et muscle entier, et à divers âges des rats (1 mois, 6 mois et 10 mois). Lors de l'utilisation de l'AFM, nous avons tenu compte de l'influence de l'angle d'inclinaison entre l'échantillon et la pointe sur la mesure de la rigidité. Des études supplémentaires ont été effectuées sur la structure ainsi que sur les phénomènes de migration et de prolifération des myoblastes. De plus, une revue de la littérature concernant les propriétés mécaniques en relation avec la DMD a été réalisée pour mieux saisir l'impact mécanique multi-échelle et temporel de la DMD sur le muscle.

L'examen des résultats a indiqué que la DMD détériore les propriétés mécaniques et structurelles du muscle à tous les stades et a également montré comment ces propriétés changent à mesure que les échelles biologiques augmentent. De plus, cette étude a permis de détecter des biomarqueurs mécaniques spécifiques qui traduisent l'état de santé du muscle à différentes échelles et stades de la maladie. Elle a aussi révélé que l'échelle de la fibre était le niveau le plus pertinent pour caractériser l'évolution de la maladie et potentiellement évaluer l'efficacité des traitements proposés.

Dans l'ensemble, cette thèse a contribué à enrichir notre compréhension de l'impact de l'absence de dystrophine sur les propriétés mécaniques du muscle à divers échelles biologiques et stades de la maladie.

Mots clés : Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD), R-DMDdel52, Muscle, Multi-échelle, Module de rigidité, Viscoélasticité, AFM, Elastographie ultrasonore.



## Abstract

Mechanics and biology are intimately linked, although the details of their interaction remain to be elucidated. The cell, the fundamental unit of biology, has mechanical properties that are governed by the cytoskeleton. The mechanical properties of biological materials are closely related to their health. Numerous studies have shown a relationship between the internal structure of these materials, their mechanical properties, and their state of health. The multi-scale structure of certain biological materials, such as muscle, adds to the complexity.

In our study, we focused on Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) as a muscle disease. We analyzed the effect of this disease on the mechanical properties of muscle (such as stiffness and viscoelasticity) using a rat model, R-DMDdel52, developed in our laboratory. The relevance of this model is demonstrated by its accurate and progressive reproduction of the human disease phenotype.

To analyze the effect of DMD on the mechanical properties of muscle, we used different techniques such as atomic force microscopy (AFM) and ultrasound elastography. Measurements were made at different scales: myoblast, myotube, muscle fiber and whole muscle, and at different ages of rats (1 month, 6 months and 10 months). When using AFM, we considered the effect of sample-tip tilt on the measured stiffness. Additional studies were performed to characterize myoblast structure, migration and proliferation. In addition, to gain a better understanding of the multi-scale and temporal mechanical effects of DMD on muscle, a review of the literature on mechanical properties related to DMD was performed.

Analysis of the results showed that DMD impairs the mechanical and structural properties of the muscle at all stages, and also showed how these properties change as the scale increases. In addition, this study allowed us to detect specific mechanical biomarkers that reflect the health status of the muscle at different scales and disease stages. It also revealed that the fiber scale is the most relevant level not only for characterizing the evolution of the disease, but also for assessing the efficiency of the proposed treatments.

Overall, this thesis has enriched our understanding of the impact of the absence of dystrophin on the mechanical properties of muscle at various scales and stages of the disease.

Keywords: Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), R-DMDdel52, Muscle, Multi-scale, Stiffness modulus, Viscoelasticity, AFM, Ultrasound elastography.

# Table des matières

Introduction .....	31
1. Cadre de la thèse .....	32
2. Relation cytosquelette – propriétés mécaniques – Etat de santé.....	35
2.1. Le cytosquelette et protéines associées :.....	35
2.1.1. Microfilaments : .....	36
2.1.2. Microtubules :.....	38
2.1.3. Filaments intermédiaires : .....	40
2.1.4. Pathologies liées à la structure du cytosquelette et ses protéines associées : .	43
2.2. Propriétés mécaniques en biologie : .....	44
2.2.1. Contrainte : .....	45
2.2.2. La déformation : .....	47
2.2.3. Rigidité et viscoélasticité :.....	48
2.2.4. Modèles rhéologiques :.....	49
2.2.5. Techniques de mesure des propriétés mécaniques des matériels biologiques :	51
2.2.6. Propriétés mécaniques au niveau de la cellule : .....	52
a. Microscope à force atomique : .....	53
b. Relation cytosquelette – propriétés mécaniques de la cellule :.....	58
2.2.7. Propriétés mécaniques au niveau du tissu : Elastographie Ultrasonore .....	59
2.2.8. Propriétés mécaniques multi-échelle :.....	64
2.3. Relation propriétés mécaniques – état de santé : .....	67
3. Muscle : .....	68
3.1. Structure du muscle squelettique .....	68
3.1.1. Muscle squelettique : .....	69
3.1.2. Fibres musculaires :.....	71

a.	Définition .....	71
b.	Cytosquelette et protéines associées de la fibre musculaire :.....	71
3.1.3.	Myogenèse, régénération musculaire et cytosquelette : .....	77
3.1.4.	Cellules satellites : .....	78
3.1.5.	Myoblastes :.....	80
3.1.6.	Myotubes :.....	83
3.2.	Maladies neuromusculaires, myopathies et dystrophie musculaires : .....	85
3.3.	Dystrophie musculaire de Duchenne : .....	86
3.3.1.	Suivi et caractérisation de la DMD : .....	90
3.3.2.	Impact de l'absence de la dystrophine sur la structure du muscle squelettique : 91	
3.3.3.	Propriétés mécaniques du muscle sain et dystrophique : .....	94
3.3.4.	Différents modèles existants et pertinence de notre modèle de RatDel52 : .	104
4.	Problématique : .....	107
5.	Structure de l'étude : .....	107
Matériels et méthodes.....		109
1.	Mise en œuvre des expériences :.....	110
2.	Modèles biologiques : .....	111
2.1.	Préparation du rat pour l'élastographie :.....	111
2.2.	Préparation de la fibre musculaire pour l'AFM :.....	113
2.3.	Culture cellulaire :.....	114
2.3.1.	Tri cellulaire : .....	115
a.	Technique de tri basé sur le « Preplating » : .....	115
b.	Centrifugation par gradient de densité de Percoll : .....	117
c.	Tri cellulaire par cytométrie en flux (FACS) : .....	118
2.3.2.	Mise en culture : .....	121
3.	Mesures expérimentales : .....	124

3.1.	Elastographie ultrasonore : .....	124
3.2.	Microscopie à force atomique :.....	126
3.2.1.	Plateforme AFM, paramètres utilisés et calibration :.....	126
3.2.2.	Evaluation du module de Young et modèle élastique : .....	127
3.2.3.	Effet de l'inclinaison locale à la surface des cellules sur les mesures AFM : 131	
3.2.4.	Distribution des données et calcul de la valeur modale : .....	135
3.2.5.	Tests de relaxation et modèle viscoélastique :.....	137
3.3.	Single cell RNA-seq : .....	141
3.4.	Western Blot : .....	142
3.5.	Immunomarquages : .....	143
3.6.	Calcul de la surface des myoblastes : .....	144
3.7.	Calcul du taux d'actine : .....	144
3.8.	Calcul du nombre et de la taille des spots de paxilline :.....	145
3.9.	Analyse de la prolifération et de la migration :.....	145
3.9.1.	Représentation des trajectoires .....	147
3.9.2.	Calcul des vitesses moyennes :.....	147
3.10.	Tests statistiques : .....	149
	Résultats .....	150
1.	Etude mécanique multi-échelle .....	152
1.1.	Echelle du myoblaste : .....	152
1.1.1.	Evaluation du module d'élasticité en fonction de l'âge : .....	152
1.1.2.	Evaluation des propriétés viscoélastiques en fonction de l'âge : .....	155
1.2.	Echelle du myotube : .....	156
1.2.1.	Evaluation du module d'élasticité en fonction de l'âge : .....	156
1.2.2.	Evaluation du module d'élasticité en fonction de l'âge et de l'échelle biologique :.....	160
1.2.3.	Evaluation des propriétés viscoélastiques en fonction de l'âge : .....	160

1.3.	Echelle de la fibre musculaire :.....	161
1.3.1.	Evaluation du module d'élasticité en fonction de l'âge : .....	161
1.3.2.	Evaluation des propriétés viscoélastiques : .....	164
1.4.	Echelle du muscle : .....	165
1.4.1.	Position neutre (position 02) : .....	166
1.4.2.	Position de flexion plantaire (position 01) : .....	169
1.4.3.	Position de dorsiflexion (position 03) : .....	172
2.	Analyses biologiques et fonctionnelles : .....	175
2.1.	Migration et prolifération des myoblastes, illustration de deux fonctions cellulaires en lien avec le cytosquelette : .....	176
2.1.1.	Facteur de prolifération : .....	176
2.1.2.	Migration .....	179
a.	Suivi des cellules (Tracking) : .....	179
b.	Vitesse de migration : .....	180
c.	Coefficient de diffusion : .....	183
d.	Persistance : .....	185
2.2.	Structure des myoblastes : .....	187
2.2.1.	Hauteur des myoblastes : .....	187
2.2.2.	Surface des cellules : .....	189
2.2.3.	Taux d'actine : .....	192
2.2.4.	Nombre de spots de paxilline : .....	195
2.2.5.	Nombre de spots de paxilline par unité de surface : .....	198
2.2.6.	Moyenne de la taille des spots de paxilline : .....	200
2.3.	Analyse des gènes des myoblastes : .....	202
2.4.	Expression de la protéine desmine par Western Blot : .....	207
	Discussion .....	209
1.	Impact de la DMD sur les propriétés mécaniques.....	211

2. Impact de la DMD sur la fonction migration et prolifération en lien avec la structure du cytosquelette .....	227
Conclusions et perspectives .....	231
Annexes .....	234
Bibliographie .....	261

## Liste des figures

Figure 1 : Micrographie de fluorescence d'un fibroblaste .....	36
Figure 2 : Schéma de la formation d'un filament d'actine. ....	38
Figure 3 : Schéma de la formation d'un microtubule et de son instabilité dynamique.....	39
Figure 4 : Illustration de l'assemblage d'un filament intermédiaire.....	42
Figure 5 : Représentation graphique montrant les structures organisées du cytosquelette d'actine, des microtubules et des filaments intermédiaires.....	43
Figure 6 : Schéma illustrant les cinq types de contraintes qui déforment les matériaux. ....	46
Figure 7 : Illustration des relations de contrainte et de déformation.....	47
Figure 8 : Courbe de traction conventionnelle .....	48
Figure 9 : Comportement général de la contrainte et de la déformation en fonction du temps pour les tests de relaxation (a) et de fluage (b). ....	49
Figure 10 : Modèles mécaniques viscoélastiques .....	50
Figure 11 : Modèle de Maxwell-Wiechert généralisé du second ordre .....	50
Figure 12 : Illustration des plages approximatives de profondeur de mesure et de résolution spatiale pour diverses cibles biologiques .....	51
Figure 13 : Illustration schématique des différentes méthodes utilisées pour mesurer les propriétés mécaniques d'une seule cellule.....	52
Figure 14 : Schéma du principe de l'AFM (Drolle et al., 2014).....	55
Figure 15 : En A) Schéma descriptif des phases d'approche et de retrait de la pointe AFM par rapport à la surface de l'échantillon. ....	56
Figure 16 : Schéma illustrant la technique d'élastographie par onde de cisaillement supersonique (Supersonic Shear wave Imaging). ....	62
Figure 17 : Génération de l'onde de cisaillement supersonique .....	63
Figure 18 : Exemple type de mesure du module élastique de cisaillement.....	64
Figure 19 : Vue multi-échelle de la mécanique cellulaire.....	65
Figure 20 : Structure hiérarchique d'os et de bambou .....	66
Figure 21 : Schéma montrant que les propriétés mécaniques sont des biomarqueurs de l'état de santé en donnant des exemples.....	67
Figure 22 : Photomicrographies des 3 types de muscle .....	68
Figure 23 : Schéma multi-échelle et hiérarchique du muscle squelettique et des structures associées adapté de Tajbakhsh et al (Tajbakhsh, 2009).....	70
Figure 24 : Schéma du cytosquelette d'une fibre musculaire.....	72

Figure 25 : Structure du sarcomère. ....	74
Figure 26 : Image prise en microscopie électronique d'un sarcomère de muscle strié.....	75
Figure 27 : Vue globale de la voie de différenciation myogénique .....	78
Figure 28 : Schéma global des étapes de la myogénèse squelettique d'un point de vue du cytosquelette.....	80
Figure 29 : Image d'immunomarquage de myoblastes WT.....	83
Figure 30 : Caractéristiques moléculaires de la DMD. ....	87
Figure 31 : Dystrophine et ses partenaires de liaison.....	93
Figure 32 : Décès prématuré, absence d'expression de la dystrophine, atrophie musculaire et atteinte fonctionnelle chez les rats R-DMDdel52. ....	107
Figure 33 : A. Courbe de correspondance entre l'âge du rat et l'âge de l'humain. B. Représentation de l'approche mécanique sur 3 dimensions de l'étude.....	108
Figure 34 : Schéma illustrant notre démarche expérimentale. ....	110
Figure 35 : Photo illustrant le banc à isoflurane (a) et un rat épilé anesthésié et déposé sur un tapis chauffant (b).....	112
Figure 36 : Schéma présentant les 3 positions qui ont été utilisées pour effectuer les mesures en élastographie.....	112
Figure 37 : Dessin illustrant l'état des muscles Tibialis Anterior (TA) et Gastrocnemius (G) lors de l'extension (a) et la flexion plantaire (b) du pied. ....	113
Figure 38 : Photo montrant une fibre musculaire collée à ses deux extrémités.....	114
Figure 39 : a. Schéma du principe du « preplating ». b. Image prise au microscope Axio....	116
Figure 40 : Histogrammes représentant des résultats de preplating .....	116
Figure 41 : Histogramme représentant les résultats d'une expérience de « preplating ».....	117
Figure 42 : Schéma de la colonne de percoll avec les différentes densités.....	117
Figure 43 : Image prise en contraste de phase de cellules mortes après un tri par centrifugation par gradient de densité de Percoll. Echelle 400 µm. ....	118
Figure 44 : Schéma du principe du FACS (Hodne & Weltzien, 2015).....	119
Figure 45 : Histogramme des pourcentages de cellules satellites obtenus par FACS sur l'ensemble des rats WT (bleu) et DMD (rose) à 1 mois, 6 mois et 10 mois.....	121
Figure 46 : Photo montrant les différentes boîtes de cultures utilisées.....	122
Figure 47 : Histogramme présentant la pureté des cultures de cellules satellites .....	123
Figure 48 : Images prises en contraste de phase de myoblastes issues d'un rat WT (a) et d'un rat DMD (b) âgé d'1 mois après 24h de culture, échelle 400 µm. ....	123



Figure 49 : Images prises en contraste de phase de myotubes issus de rat WT (a) et de rat DMD (b) après 24h de culture, échelle 400 $\mu\text{m}$ .	124
Figure 50 : a. Représentation de l'expérience d'élastographie. b. Elastographe Aixplorer MACH 30 de Supersonic Imagine. c. Sonde SuperLinear <sup>TM</sup> SLH20-6.	125
Figure 51 : Exemple d'image obtenue lors de l'élastographie du muscle TA (jaune).	126
Figure 52 : Photos montrant le Microscope à Force Atomique (AFM) et ses différents composants.	127
Figure 53 : Vue en microscopie électronique à balayage de la sonde $\mu\text{mash}$ CSC 38 (laboratoire ICMPE, Vitry, UPEC).	127
Figure 54 : Images en contraste de phase lors des mesures de la rigidité des myoblastes (a), myotubes (b) et fibre musculaire (c).	128
Figure 55 : Impression d'écran de l'interface graphique du programme Matlab <sup>®</sup> .	129
Figure 56 : Cartographie du module l'élasticité (a), de la topographie (b) et une vue latérale (c) d'un myotube DMD mesuré par AFM.	130
Figure 57 : Exemple de résultats obtenus pour une fibre.	131
Figure 58 : Exemple des résultats obtenus lors d'une mesure.	134
Figure 59 : Ecart moyen (+ écart type) en %, présenté pour toutes les données et par rat ...	135
Figure 60 : Coefficient d'asymétrie (skewness en anglais), mesure l'asymétrie de la distribution d'une variable aléatoire réelle.	135
Figure 61 : Exemple de fonction de densité de probabilité par noyau utilisée pour calculer la valeur modale de nos distributions.	136
Figure 62 : Distribution du module d'élasticité sur un myotube.	136
Figure 63 : a. Exemple de test de relaxation par AFM sur un temps de 10s.	138
Figure 64 : Schéma de l'indentation d'une pointe pyramidale.	139
Figure 65 : Capture d'écran du programme Matlab <sup>®</sup> .	141
Figure 66 : Immunomarquage réalisé sur un myoblaste DMD âgé de 6 mois.	144
Figure 67 : a. Histogramme de la répartition des niveaux de gris dans l'image d'un myoblaste DMD de 6 mois avec les deux seuils utilisés.	145
Figure 68: Processus utilisé pour le calcul du nombre de spots de paxilline et de leur surface à partir d'images acquises en microscopie confocale.	145
Figure 69 : Aperçu de l'interface ImageJ du plugin de « Cell counter notice ».	146
Figure 70 : Schéma de la trajectoire de myoblastes issus d'un rat WT âgé de 6 mois.	147
Figure 71 : Histogramme montrant les valeurs moyennes des rigidités des myoblastes par cellule pour des rats WT et DMD suivant l'âge (mois).	153

Figure 72 : Histogramme montrant les valeurs moyennes des rigidités des myoblastes par rat WT et DMD en fonction de l'âge des rats (en mois). .....	154
Figure 73 : Courbes de relaxation montrant l'évolution des contraintes normalisées .....	156
Figure 74 : Images en contraste de phase de myotubes. a : WT ; b : DMD.....	157
Figure 75 : Histogramme montrant les moyennes des rigidités des myotubes par cellule pour des rats WT et DMD suivant l'âge (mois) .....	158
Figure 76 : Histogramme montrant les moyennes des rigidités des myotubes par rat WT et DMD suivant l'âge (mois).....	159
Figure 77 : Courbes de relaxation montrant l'évolution des contraintes normalisées en fonction du temps pour des myotubes issus de rats WT et DMD âgés d'1 mois et de 6 mois.....	161
Figure 78 : Histogramme montrant les moyennes des rigidités des fibres par cellule pour des rats WT et DMD suivant l'âge (mois).....	162
Figure 79 : Histogramme montrant les moyennes des rigidités des fibres par rat WT et DMD suivant l'âge (mois).....	163
Figure 80 : Courbes de relaxation montrant l'évolution des contraintes normalisées en fonction du temps pour des fibres issues de muscles EDL.....	164
Figure 81 : Histogramme montrant la comparaison entre les moyennes des rigidités des pattes droites et gauches pour les rats WT et DMD âgés de 10 mois.....	166
Figure 82 : Histogramme montrant les moyennes des rigidités des muscles TA en position neutre par rat WT et DMD suivant l'âge (mois) .....	167
Figure 83 : Histogramme montrant les moyennes des rigidités des muscles TA en position neutre par rat WT et DMD suivant l'âge (mois). .....	168
Figure 84 : Histogramme montrant les moyennes des rigidités des muscles TA en position de flexion plantaire par rat WT et DMD suivant l'âge (mois).....	170
Figure 85 : Histogramme montrant les moyennes des rigidités des muscles TA en position de flexion plantaire par rat WT et DMD suivant l'âge (mois).....	171
Figure 86 : Histogramme montrant les moyennes des rigidités des muscles TA en position de dorsiflexion par rat WT et DMD suivant l'âge (mois).....	173
Figure 87 : Histogramme montrant les moyennes des rigidités des muscles TA en position de dorsiflexion par rat WT et DMD suivant l'âge (mois).....	174
Figure 88 : Histogramme montrant les moyennes des rigidités des muscles TA dans toutes les positions par rat WT et DMD âgés de 10 mois. ....	175
Figure 89 : Histogramme montrant les moyennes des facteurs de prolifération des myoblastes par cellule pour des rats WT et DMD suivant l'âge (mois) .....	178

Figure 90 : Histogramme montrant les moyennes des facteurs de prolifération des myoblastes par rat WT et DMD suivant l'âge (mois). .....	179
Figure 91 : Suivi cellulaire sur un plan (x,y) de l'ensemble des myoblastes de rats WT et DMD d'1 mois et de 6 mois. ....	180
Figure 92 : Histogramme montrant les moyennes des vitesses de migration des myoblastes par cellule pour des rats WT et DMD suivant l'âge (mois) .....	182
Figure 93 : Histogramme montrant les moyennes des vitesses de migration des myoblastes par rat WT et DMD suivant l'âge (mois). ....	183
Figure 94 : Histogramme montrant les moyennes des coefficients de diffusion des myoblastes par cellule pour des rats WT et DMD suivant l'âge (mois) .....	184
Figure 95 : Histogramme montrant les moyennes des coefficients de diffusion des myoblastes par rat WT et DMD suivant l'âge (mois). ....	185
Figure 96 : Histogramme montrant les moyennes des temps de persistance des myoblastes par cellule pour des rats WT et DMD suivant l'âge (mois) .....	186
Figure 97 : Histogramme montrant les moyennes des temps de persistance des myoblastes par rat WT et DMD suivant l'âge (mois) .....	187
Figure 98 : Histogramme montrant les moyennes des hauteurs des myoblastes par cellule pour des rats WT et DMD suivant l'âge (mois) .....	188
Figure 99 : Histogramme montrant les moyennes des hauteurs des myoblastes par rat WT et DMD suivant l'âge (mois).....	189
Figure 100 : Histogramme montrant les moyennes des surfaces des myoblastes par cellule pour des rats WT et DMD suivant l'âge (mois) .....	190
Figure 101 : Histogramme montrant les moyennes des surfaces des myoblastes par rat WT et DMD suivant l'âge (mois).....	191
Figure 102 : Marquage des filaments d'actine des myoblastes.....	192
Figure 103 : Histogramme montrant les moyennes des taux d'actine .....	193
Figure 104 : Histogramme montrant les moyennes des taux d'actine des myoblastes par rat WT et DMD suivant l'âge (mois).....	194
Figure 105 : Histogramme montrant les moyennes des nombres de spots de la paxilline des myoblastes par cellule pour des rats WT et DMD suivant l'âge (mois) .....	196
Figure 106 : Histogramme montrant les moyennes des nombres de spots de paxilline des myoblastes par rat WT et DMD suivant l'âge (mois). ....	197
Figure 107 : Histogramme montrant les moyennes des nombres de spots de paxilline par unité de surface ( $\mu\text{m}$ ) des myoblastes .....	199

Figure 108 : Histogramme montrant les moyennes des nombres de spots de paxilline par unité de surface ( $\mu\text{m}$ ) des myoblastes par rat WT et DMD suivant l'âge (mois). .....	200
Figure 109 : Histogramme montrant les moyennes de tailles des spots de paxilline des myoblastes par cellule pour des rats WT et DMD suivant l'âge (mois). .....	201
Figure 110 : Histogramme montrant les moyennes de la moyenne de taille des spots de paxilline des myoblastes par rat WT et DMD suivant l'âge (mois). .....	202
Figure 111 : Heatmap des différents gènes surexprimés et sous-exprimés chez les myoblastes DMD comparé au myoblastes WT .....	203
Figure 112 : Schéma représentant les gènes sous-exprimés (en bleu) et des gènes surexprimés (en rouge) pour le phénotype DMD .....	206
Figure 113 : Histogramme des moyennes d'expression de la protéine desmine .....	208
Figure 114 : Histogramme de l'évolution de la rigidité par échelle biologique pour chaque âge de rat WT. ....	213
Figure 115 : Histogramme de l'évolution de la rigidité par échelle biologique pour chaque âge de rat DMD. ....	214
Figure 116 : Hypothèse d'un continuum mécanique .....	216
Figure 117 : Histogramme montrant les pourcentages de différence de rigidité entre les rats WT et DMD à différentes échelles biologiques pour chaque âge. ....	217
Figure 118 : Histogramme montrant les pourcentages de différence de rigidité entre les rats WT et DMD à différents âges pour chaque échelle biologique. ....	218
Figure 119 : Récapitulatif des courbes de contrainte normalisée pour les myoblastes, myotubes et fibres issus de rats WT et DMD d'1 mois et 6 mois. ....	222
Figure 120 : Histogramme montrant les pourcentages de relaxation de la contrainte à 2s pour les myoblastes, myotubes et fibres issus de rats WT et DMD d'1 mois et 6 mois. ....	223
Figure 121 : Nous avons positionné sur un graphique, qui montre des relaxations normalisées, nos valeurs (à 2 secondes) pour les fibres de rats WT et DMD âgés de 1 mois .....	224
Figure 122 : a. Histogramme montrant les tailles normalisées de spots de paxilline des myoblastes WT et DMD d'1 mois et 6 mois. b. Courbe de comparaison de la relation entre la taille des sites l'adhérence focale et de la vitesse de migration de la cellule .....	228

## Liste de tableaux

Tableau 1 : Revue des mesures de rigidité effectuée sur plusieurs échelles du muscle : Myoblastes, myotubes, fibres musculaires, sections de muscle, muscle en entier. Ces mesures ont été réalisées à l'aide de plusieurs techniques, la microscopie à force atomique AFM, l'élastographie ultrasonore UE et l'élastographie à résonance magnétique.....	95
Tableau 2 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la rigidité des myoblastes.....	152
Tableau 3 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la viscosité des myoblastes.....	155
Tableau 4 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la rigidité des myotubes. ....	157
Tableau 5 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la viscosité des myotubes. ....	160
Tableau 6 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la rigidité des fibres musculaires.....	162
Tableau 7 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la viscosité des fibres musculaires.....	164
Tableau 8: Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la rigidité des muscles en position neutre. ....	166
Tableau 9 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la rigidité des muscles en position de flexion plantaire. ....	169
Tableau 10 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la rigidité des muscles en position de dorsiflexion. ....	172
Tableau 11 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la prolifération des myoblastes WT et DMD. ....	177
Tableau 12 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la vitesse de migration des myoblastes WT et DMD. ....	180
Tableau 13 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant le coefficient de diffusion des myoblastes WT et DMD.....	183
Tableau 14 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant le temps de persistance des myoblastes WT et DMD. ....	185
Tableau 15 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la hauteur des myoblastes WT et DMD. ....	188

Tableau 16 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la surface des myoblastes WT et DMD. ....	189
Tableau 17 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant le taux d'actine des myoblastes WT et DMD. ....	192
Tableau 18 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant le nombre de spots de paxilline des myoblastes WT et DMD. ....	195
Tableau 19 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant le nombre de spots de paxilline par unité de surface des myoblastes WT et DMD.....	198
Tableau 20 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la taille moyenne des spots de paxilline des myoblastes WT et DMD. ....	201
Tableau 21 : Tableau des nomenclatures des gènes surexprimés chez les myoblastes WT. .	203
Tableau 22 : Tableau indiquant les gènes surexprimés chez les myoblastes WT, leur taux de variation en échelle logarithmique, les processus biologiques dans lesquels ils sont impliqués, leur type d'élément cellulaire et leur classe de protéine. ....	204
Tableau 23 : Tableau des nomenclatures des gènes surexprimés chez les myoblastes DMD	205
Tableau 24 : Tableau indiquant les gènes surexprimés chez les myoblastes DMD, leur taux de variation en échelle logarithmique, les processus biologiques dans lesquels ils sont impliqués, leur type d'élément cellulaire et leur classe de protéine. ....	205

## Abréviations

- AAP : Actin Associated Proteins.
- ADP : Adenosine diphosphate.
- AFM : Atomic Force Microscope
- ANOVA : Analyse of Variance
- ATP : Adenosine triphosphate.
- BMD : Becker Muscular Dystrophy.
- CK : Créatine kinase.
- CVF : Capacité vitale forcée.
- DGC : Dystroglycan complex.
- DMD : Duchenne Muscular Dystrophy.
- EDL : Muscle Extensor Digitorum Longus.
- FACS : Fluorescence-activated cell sorting.
- FGF : Fibroblast growth factor.
- FI : Filament intermédiaire.
- GDP : Guanosine diphosphate.
- GTP : Guanosine triphosphate.
- IRM : Imagerie par résonance magnétique.
- MAP : Microtubule associated proteins.
- Mdx : Muscular dystrophy x-linked mouse.
- MEC : Matrice extracellulaire.
- MHC : Myosin Heavy Chain.
- MRF4 : Myogenic regulatory factor 4.
- MSD : Mean square displacement.
- MT : Microtubule.
- MTOC : Microtubule organizing center.
- Myf5 : Myogenic factor 5.
- Myl1 : Myosin light chain.
- MyoD : Myoblast determination protein.
- MyoG : Myogenic factor 4.
- ncMTOC : Non-centrosomal microtubule organizing center.
- nNOS : Neuronal Nitric Oxide Synthase.
- PAX3 : Paired box gene 3.
- PAX7 : Paired box gene 7.
- R-DMDdel52 : Rat DMD avec délétion de l'exon 52.
- rpm : revolutions per minute.
- SC : Satellite cell.
- scRNA-Seq : Single cell RNA sequencing.
- SWE : Shear Wave Elastography.
- TA : Muscle Tibialis Anterior.
- TFG : TRK-fused gene.
- US : Ultrasound.
- WT : Wild Type.







## Préambule :

Ayant grandi auprès d'un père chercheur en économie, d'une mère enseignante en biologie au lycée et d'une sœur statisticienne, j'ai toujours manifesté de l'intérêt pour les équations, les mathématiques, la physique, la chimie et pour tout ce qui a attiré aux raisonnements théoriques, et exprimé une fascination pour le corps humain, sa composition et sa complexité. Curieux par nature, enfant je me demandais toujours comment, à la seconde où je décidais de fermer ma main, celle-ci exécutait le mouvement quasi instantanément. L'idée que ces phénomènes pouvaient être régis par des équations très complexes a rapidement germé dans ma tête.

A la suite de l'obtention de mon baccalauréat, j'ai souhaité m'orienter vers les sciences des matériaux avec comme perspective l'ambition d'étudier plus spécifiquement les matériaux biologiques. C'est pour cela que, dès que l'occasion s'est présentée de réaliser mon stage de Master 2 « Nanotechnologies » de l'Université Paris-Saclay en « Biophysique », j'ai accepté sans hésitation. Ce stage, réalisé sous la direction de Redouane et Sophie, avait pour objectif d'étudier l'effet de l'angle d'inclinaison entre la pointe de l'indenteur d'un microscope à force atomique et le substrat sur la mesure de rigidité. Ce travail a été mené sur des supports de type gels de polyacrylamide, classiquement utilisé en mécanobiologie. A la fin de ce stage, mon équipe d'accueil, dirigée par Mme Dufour devait intégrer le laboratoire de Mr Relaix dont la thématique générale de recherche portait sur le système neuromusculaire, la biologie du muscle et ses pathologies associées. Dans ce cadre, on m'a proposé de poursuivre vers un travail de thèse qui avait pour objet la caractérisation d'un point de vue mécanique de la maladie génétique la Dystrophie Musculaire de Duchenne, décrite plus en détail dans l'introduction de ce manuscrit. Cette approche basée sur la biomécanique cellulaire, était nouvelle au laboratoire et devait venir compléter celles déjà développées et principalement axées sur la biologie cellulaire et la biochimie. Pour ma part, j'ai vu dans cette proposition une opportunité de faire ce que j'ai toujours voulu, à savoir appliquer la physique à la biologie pour décrire les comportements des systèmes biologiques à l'aide d'équations mathématiques et physiques, d'autant que l'importance des aspects multi-échelle et temporel de cette étude sont apparus dès le début de mon travail de thèse.

Avant d'entamer ma thèse, je n'avais étudié que des matériaux inertes à savoir des alliages, des composites, des céramiques ou même des gels de polyacrylamide durant mon stage. Contrairement à ce type de matériaux, les cellules animales, et plus précisément les cellules musculaires, que j'ai découvert durant ma thèse, présentent une structure interne ultra-

organisée, sont dynamiques et sont capables d'interagir entre elles et avec l'environnement extérieur. Comme l'a suggéré Paul Alfred Weiss, biologiste cellulaire et du développement, dans sa conférence en 1960, « la cellule n'est pas seulement un terrain de jeu inerte pour quelques molécules organisées et omnipotentes, mais plutôt un système hiérarchiquement ordonné d'espèces de molécules, de groupements moléculaires et d'entités supramoléculaires interdépendants ; et que la vie, par la vie cellulaire, dépend de l'ordre de leurs interactions » (Weiss, 1962). L'idée que la cellule forme un tout intégré est alors proposée. Grâce à ses nombreuses propriétés, la cellule peut alors être perçue comme un matériau biologique très complexe. Ce travail de thèse m'a permis d'explorer une infime partie de cette complexité.

# Introduction

## 1. Cadre de la thèse

L'équipe "Biologie du système neuromusculaire" dirigée par le professeur Frédéric Relaix à l'IMRB se concentre sur l'étude des maladies neuromusculaires, un ensemble de troubles qui affectent la fonction du muscle squelettique. Ces affections sont actuellement dépourvues de traitement et entraînent une invalidité majeure pour la plupart des patients, avec des cas de décès prématuré. L'équipe possède une large gamme de compétences scientifiques, allant de la recherche fondamentale à la pathophysiologie, en passant par la recherche clinique, la modélisation clinique et l'ingénierie cellulaire et tissulaire, au service de la recherche sur ces maladies neuromusculaires, en général très invalidantes, dont certaines sont mortelles et la vaste majorité sans traitement. Les objectifs scientifiques du projet de l'équipe sont doubles :

En premier lieu, un objectif majeur de l'équipe est d'identifier et caractériser les cellules souches du muscle au niveau cellulaire et moléculaire. Ces recherches visent à mieux comprendre les capacités de réparation des cellules souches musculaires, leurs interactions avec l'environnement cellulaire local et global du patient. L'objectif final est de développer des stratégies de médecine régénérative en utilisant ces cellules souches.

En second lieu, l'équipe cherche à approfondir la connaissance des maladies neuromusculaires en identifiant leurs origines génétiques ou environnementales, ainsi que les mécanismes pathogéniques sous-jacents. L'objectif est de développer des outils thérapeutiques innovants pour le diagnostic et le traitement de ces maladies. Cela inclut l'évaluation de l'efficacité et de la sécurité de ces outils thérapeutiques à travers des modèles précliniques sur des animaux, avec l'objectif de transférer ces connaissances pour la mise en place d'essais cliniques sur les patients.

Parmi les différentes approches innovantes mises en œuvre par l'équipe, on retrouve l'identification de biomarqueurs mécaniques. Ces biomarqueurs peuvent être définis comme des caractéristiques ou des mesures quantitatives de nature mécanique, idéalement inhérentes au matériau, et pouvant fournir des indications sur une maladie, un état clinique, une fonction biologique ou une réponse pharmacologique (Eroles et al., 2023). Malgré la diversité des origines biologiques, les paramètres mécaniques peuvent être évalués de manière extrêmement précise à différentes échelles biologiques, ce qui les rend particulièrement avantageux pour la détection de biomarqueurs.

Les mécaniques cellulaire et tissulaire constituent une démarche hautement quantitative qui est liée à divers états physiopathologiques. Cette relation découle de l'étroite connexion entre la mécanique cellulaire et les activités physiologiques du cytosquelette cellulaire. Le cytosquelette est une structure en réseau de biopolymères qui relie plusieurs organites et qui joue un rôle essentiel dans des fonctions physiologiques clés telles que le cycle cellulaire, la migration, l'adhésion et la morphologie. Le cytosquelette cellulaire génère des forces de différentes natures, telles que des tensions contractiles sur les fibres de stress, des forces de compression pour étendre les filopodes, des forces de traction sur les adhérences focales lors de la migration, ou encore des tensions corticales dans le cortex cellulaire. Les modifications de ce réseau particulier induisent des changements mécaniques aux échelles micro et nano-dimensionnelles, dont les propriétés mécaniques sont associées à certaines maladies ou affections, allant des maladies cardiovasculaires et auto-immunes aux maladies oncologiques. De même, la matrice extracellulaire (MEC), qui est composée de protéines filamenteuses telles que les collagènes et les laminines, subit des réorganisations qui entraînent des changements mécaniques dans les tissus. Ainsi, les réorganisations, les mutations ou les modifications post-traductionnelles du cytosquelette et des protéines de la MEC, induites par des pathologies, peuvent être rapidement détectées grâce à des changements dans la mécanique cellulaire et tissulaire (Eroles & Rico, 2023).

Au cours des deux dernières années, notre centre de recherche a acquis deux bancs expérimentaux dans le but principal est de mesurer les propriétés mécaniques des matériaux biologiques. Le premier banc est spécifiquement dédié à l'élastographie par imagerie par ultrasons, une technique qui a déjà fait ses preuves pour étudier la mécanique des tissus à une échelle macroscopique, et qui est largement utilisée dans le domaine médical. Le second banc utilise la microscopie à force atomique, qui se révèle indéniablement être un outil puissant et polyvalent au niveau nanométrique, et qui connaît une croissance significative dans les laboratoires de recherche biologique et médicale modernes. L'une des utilisations les plus répandues de l'AFM en mécanique cellulaire est la spectroscopie de force AFM pour mesurer la rigidité cellulaire et la rhéologie.

D'autre part, dans le but de réduire l'écart entre les études précliniques et thérapeutiques, notre équipe a développé un modèle de Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) chez le rat. Ce modèle, connu sous le nom de R-DMDdel52, est caractérisé par une délétion de l'exon 52 qui conduit à une absence complète de la protéine dystrophine. Les animaux R-DMDdel52 ont un phénotype qui reproduit de manière plus fidèle la trajectoire physiopathologique de la DMD

humaine par rapport au modèle de souris mdx. Les rats R-DMDdel52 présentent des caractéristiques spécifiques observées chez les patients avec une myopathie musculaire de Duchenne, telles qu'une perte musculaire squelettique progressive et sévère, accompagnée de dépôts de tissu fibreux, d'infiltration de graisse et de modifications des types de fibres musculaires. De plus, une fibrose précoce a été observée dans les muscles cardiaques. Ces changements histologiques ont entraîné des déficiences fonctionnelles graves au niveau musculaire, respiratoire et cardiaque, entraînant une mortalité précoce vers l'âge d'un an (Taglietti et al., 2022).

L'identification de biomarqueurs chez les animaux R-DMDdel52, en évaluant de manière quantitative la gravité des altérations des composants de la musculature striée à différentes échelles biologiques, apportera indéniablement une meilleure caractérisation de la pathologie.

En conclusion, l'approche combinée qui utilise le modèle préclinique de rat R-DMDdel52 avec un phénotype prononcé de la DMD, couplé à l'utilisation de l'UE et de l'AFM qui est reconnu pour sa haute sensibilité et ses performances à l'échelle nanométrique, représente une avancée précieuse dans le domaine de la médecine translationnelle. Cette approche ouvre de nouvelles perspectives dans l'évaluation des stratégies thérapeutiques les plus prometteuses dans le contexte de la DMD.

## 2. Relation cytosquelette – propriétés mécaniques – Etat de santé

### 2.1. Le cytosquelette et protéines associées :

Le cytosquelette est un réseau de polymères structurel retrouvé au sein du cytoplasme des cellules eucaryotes. Le terme « cytosquelette » a été utilisé pour la première fois en 1931 par Paul Winterbert, un embryologiste et biologiste français (Wintrebert, 1931). Comme son nom l'indique, le mot cytosquelette se décompose en 2 mots : « cyto » qui vient du grec ancien « kutos » et qui signifie cellule ou cavité, et « squelette » qui vient du grec ancien « skeletós » et qui veut dire desséché. Le cytosquelette est donc littéralement le squelette de la cellule (Collinsdictionary). Cependant, contrairement au squelette humain, il est loin d'être une structure fixe. Il forme plutôt un réseau complexe, dynamique et adaptatif de bio-polymères protéiques, filamenteux et interconnectés, associés à des protéines régulatrices. Il est composé de 3 composantes majeures : Les microfilaments (aussi appelés filaments d'actine), les microtubules et les filaments intermédiaires (Figure 1). Ces 3 filaments cytosquelettiques diffèrent fortement au niveau de leur identité chimique, de leur structure filamenteuse, de leur dynamique de (dé)polymérisation, et aussi dans leur organisation tridimensionnelle. Cependant, ils interagissent entre eux et se régulent réciproquement afin d'assurer la stabilité mécanique de la cellule et ses changements de forme (Huber et al., 2015).

En marge de ces 3 principales catégories de filaments, on trouve d'autres protéines filamenteuses du cytosquelette qui n'appartiennent à aucune de ces catégories telles que la septine (Mostowy et al., 2012) ou la spectrine (De Matteis et al., 2000; Morrow et al., 2011). Par ailleurs, la structure 3D formée par l'ensemble de ces 3 types de polymères est rendue possible grâce à la présence de centaines de protéines associées au cytosquelette. On retrouve, par exemple les protéines de pontage, les protéines capuchon, les protéines dépolymérisantes et les moteurs moléculaires, telles les myosines, les kinésines ou les dynéines.



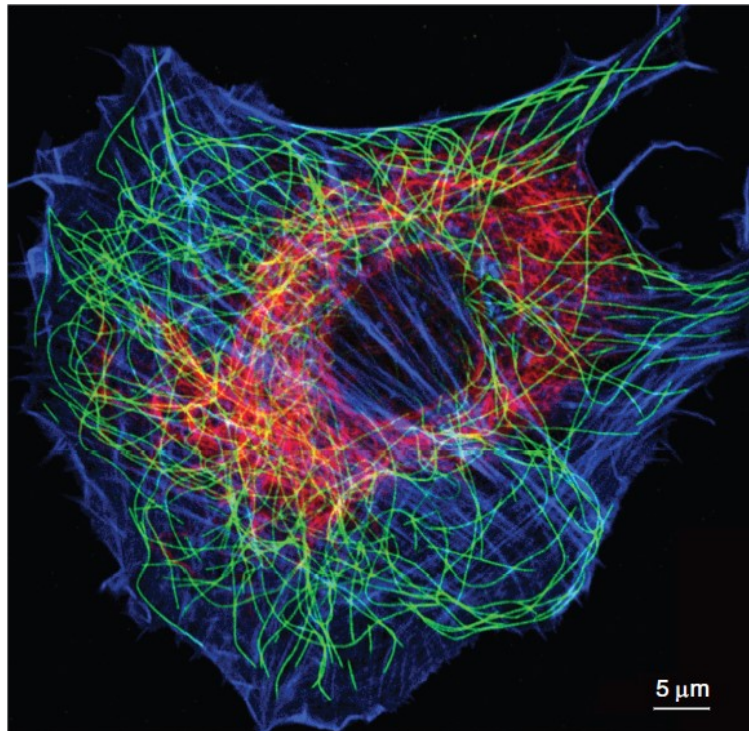


Figure 1 : Micrographie de fluorescence d'un fibroblaste en culture marqué à la phalloïdine pour révéler les filaments d'actine (bleu), et avec des anticorps spécifiques pour identifier les microtubules et les filaments intermédiaires respectivement représentés en vert et rouge. Les microtubules sont suffisamment grands pour être résolus par microscopie en champ clair, mais les filaments d'actine (bleus) et les filaments intermédiaires (rouges) sont trop petits et trop denses pour être résolus. Les filaments intermédiaires se concentrent sur la région périphérique du noyau et s'étendent de façon radiale vers la surface de la cellule (T. D. Pollard et al., 2018)

### 2.1.1. **Microfilaments :**

Les microfilaments, aussi appelés filaments d'actine ou actine F, sont des filaments protéiques de structure hélicoïdale de 6-7 μm de long (Sept et al., 1999) et d'environ 8 nm de diamètre (Alberts, 2017). Ces filaments sont formés par la polymérisation de monomères d'actine globulaire appelée actine G. Celle-ci est synthétisée en tant que polypeptide qui se replie en forme de U donnant naissance à une cavité centrale qui lie l'ATP et l'ADP (Figure 2.a) (Hardin et al., 2022). Sous certaines conditions physiologiques, ces monomères se polymérisent en dimères et trimères (Figure 2.b). Arrivée au stade de trimères, la nucléation d'actine F devient beaucoup plus rapide mais dépend toujours de la concentration d'actine G dans le cytoplasme. L'actine G étant polarisée, l'actine F résultante est, elle aussi, polarisée. Son extrémité la moins dynamique est appelée extrémité (-) et le côté le plus dynamique extrémité (+). L'extrémité (+) a un pouvoir de polymérisation 10 fois plus élevé que l'extrémité (-) (Figure 2.c) (Pollard, 2016).

Les microfilaments sont liés à beaucoup de protéines associées et de régulation (AAP) puisque plus de 150 protéines ont des domaines de liaison spécifique à l'actine (Dos Remedios et al., 2003). Parmi ces protéines nous trouvons le moteur protéique myosine (Sweeney et al., 2018), le complexe de nucléation de l'actine Arp2/3 (Veltman et al., 2010) ou des protéines de liaison de l'actine telles que l' $\alpha$ -actinine (Maruyama et al., 1965). Ces protéines régulent beaucoup de processus qui touchent la dynamique spatiale et temporelle des filaments d'actine, tels que la nucléation, l'allongement et la dépolymérisation des filaments d'actine (Svitkina, 2018).

Ensemble, l'actine F et ses protéines associées se combinent pour former des structures complexes comme les lamellipodes, les filopodes, les fibres de stress pour ne citer que ceux-ci (Figure 5).

Le lamellipode est une projection membranaire plate que l'on trouve à l'avant des cellules mobiles. Il est composé d'un réseau de filaments d'actine, qui sont liés par des protéines de liaison d'actine comme le complexe Arp2/3 (Small et al., 2002). L'actine étant polarisée, l'extrémité (+) des filaments, celle qui se polymérise rapidement, est orientée vers l'extérieur de la cellule et l'extrémité (-) vers l'intérieur. Ceci provoque un mouvement en tapis roulant (Cramer, 1997). Dans ces lamellipodes, il y a de petites projections cytoplasmiques appelées filopodes qui sont, elles aussi, composées de microfilaments réticulés par des AAPs (Mattila et al., 2008). Celles-ci jouent un rôle important dans la détection des signaux de l'environnement (Gomez et al., 2014). Quant aux fibres de stress, ce sont des faisceaux contractiles composés de filaments d'actine reliés par la myosine et d'autres protéines associées (Tojkander et al., 2012). Ces fibres sont connues pour jouer un rôle primordial dans la contraction et sont donc impliquées dans différents processus au sein de la cellule tels que l'adhésion et la migration (Kreis et al., 1980)

La structure de ces microfilaments ainsi que leur régulation par leurs protéines associées expliquent pourquoi ceux-ci participent à de nombreuses fonctions au sein de la cellule. Ces fonctions incluent la motricité (Y. I. Wang, 1985) et la forme de la cellule, par interaction avec des protéines motrices comme la myosine (T. D. Pollard et al., 2009), le transport intracellulaire à courte distance (Titus, 2018) et notamment le transport des filaments intermédiaires (Leube et al., 2017), la contraction musculaire (Houdusse et al., 2016), la cytokinésie (Glotzer, 2016), l'endocytose (Mooren et al., 2012), l'exocytose (Porat-Shliom et al., 2013) ainsi que la mécanotransduction, notamment au travers des fibres de stress et les liens entre les filaments d'actine et les adhésions focales (BurrIDGE, 2013; N. Wang, 2017). Notons que la rigidité des

microfilaments d'actine est de l'ordre du GPa comme pour le plexiglas (Howard, 2001; Kojima, 1994).

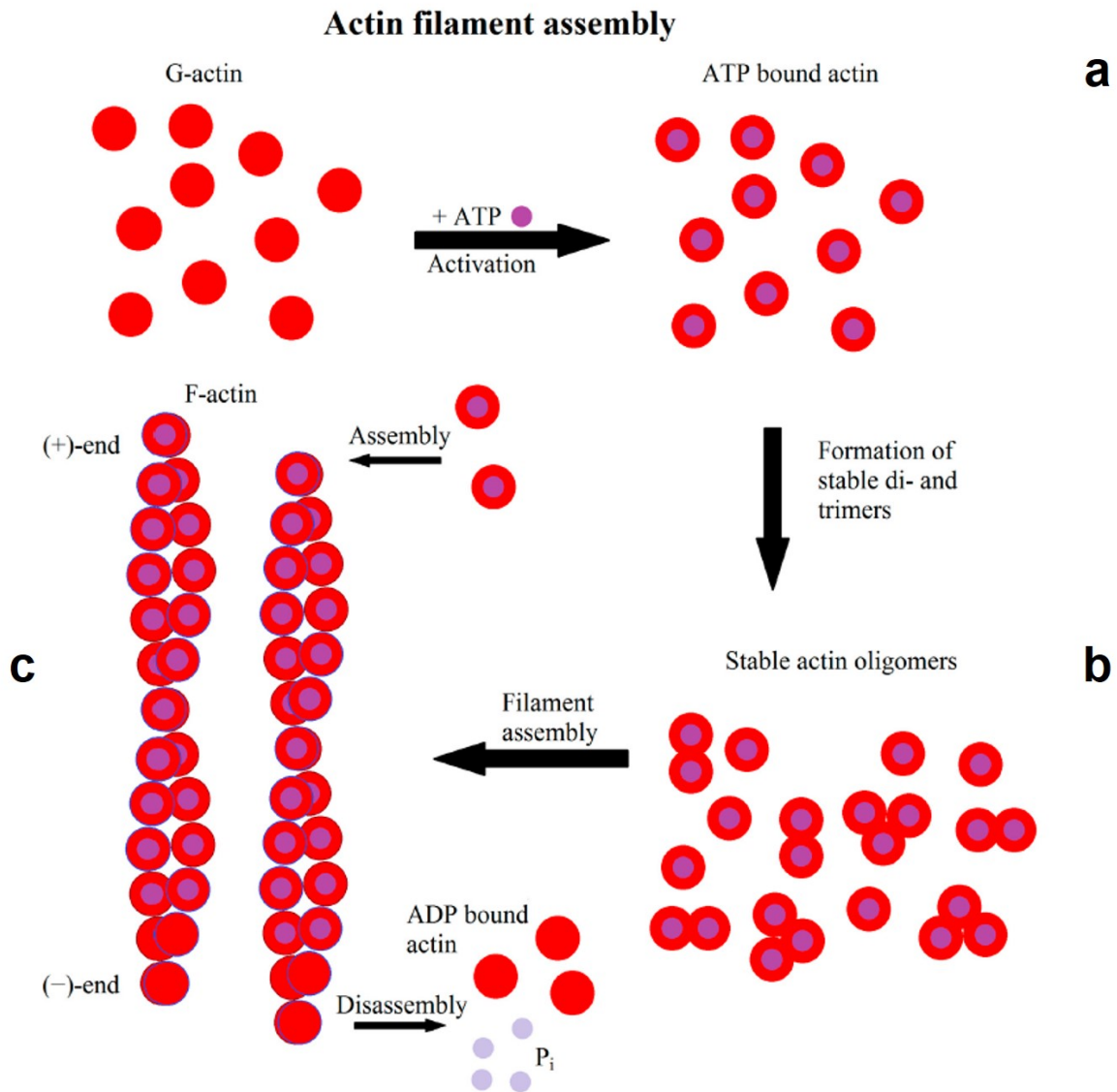


Figure 2 : Schéma de la formation d'un filament d'actine. Premièrement, l'actine G se lie à l'ATP pour former des di- ou trimères. Ces derniers s'assemblent et forment des filaments. Ces derniers s'allongent par addition de monomères. L'hydrolyse de l'ATP en ADP conduit à une distinction entre l'extrémité (+) qui croît rapidement et l'extrémité (-) qui se dissocie et qui croît lentement (Hohmann et al., 2019).

### 2.1.2. Microtubules :

Les microtubules (MTs) sont des polymères composés d' $\alpha$  et  $\beta$ -tubuline qui se lient pour former des dimères. Ces derniers s'associent entre eux de façon alternée pour former des protofilaments. Un microtubule résulte de l'association en parallèle de 13 protofilaments qui s'organisent en forme de cylindre creux. Les monomères  $\alpha$  et  $\beta$  étant liés de façon alternée, l'extrémité du protofilament, qui expose l' $\alpha$  tubuline, est notée extrémité (-), tandis que l'autre

qui expose la  $\beta$  tubuline est appelée extrémité (+) (Figure 3.a). Lors de la genèse d'un microtubule, les protofilaments conservent tous la même polarité ce qui implique que le microtubule formé est polarisé avec une extrémité (+) et l'autre (-) (Goodson et al., 2018) (Figure 3.b).

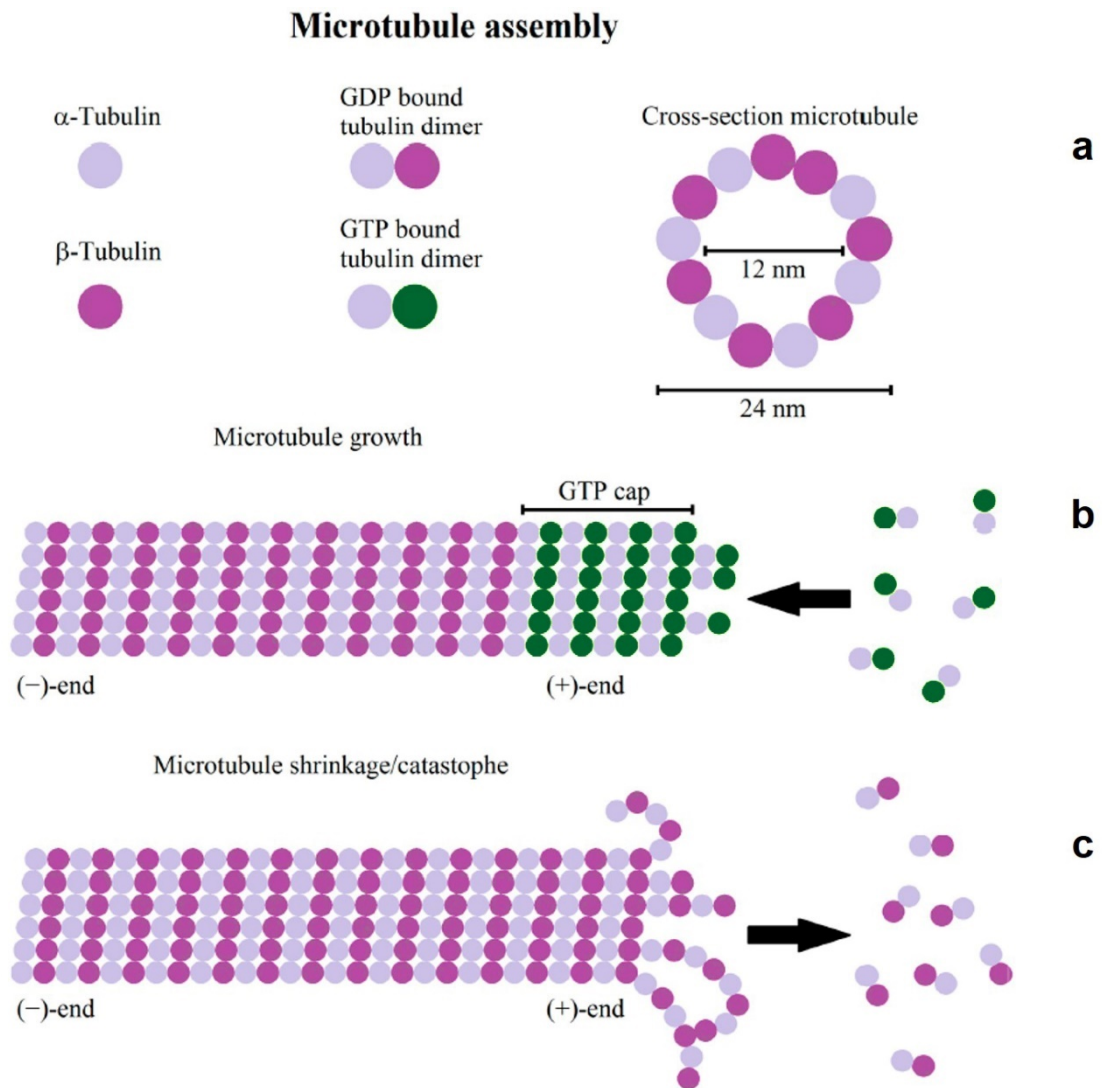


Figure 3 : Schéma de la formation d'un microtubule et de son instabilité dynamique. Le microtubule, composé d'hétérodimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ , s'organise en un tube creux et s'allonge par addition d'hétérodimères. Le microtubule est protégé de l'effondrement grâce à la présence d'un capuchon GTP à son extrémité (+) (Hohmann & Dehghani, 2019)

Plus précisément, la nucléation des microtubules commence à leur extrémité (-) au niveau des centres d'organisation des microtubules (MTOC), généralement appelés centrosomes (Doxsey, 2001) (Figure 5). Ces MTOC contiennent de la  $\gamma$  tubuline qui se lie à ces dimères pour déclencher cette nucléation (Wu et al., 2017). L' $\alpha$  et  $\beta$  tubuline se lient chacune à une molécule de GTP (Guanosine TriPhosphate). Cependant, la GTP liée à la  $\beta$  tubuline peut être hydrolysée en GDP après la polymérisation (mais pas instantanément) (Carlier et al., 1981). La GDP-

tubuline étant plus sujette à la dépolymérisation, la polymérisation de la  $\beta$  tubuline liée à la GTP doit donc être plus rapide afin d'éviter que l'extrémité (+) soit riche en GDP et ne se dépolymérise. Cette vitesse de polymérisation dépend principalement de la concentration de  $\beta$  tubuline liée à la GTP dans la cellule. Cette « protection » envers la dépolymérisation s'appelle le GTP-cap ou capuchon GTP. Dans le cas contraire, c'est-à-dire quand l'hydrolyse de la GTP en GDP est plus rapide que la polymérisation à cause de la faible concentration en tubuline  $\beta$ , le microtubule se dépolymérise et ce phénomène est appelé « catastrophe » (Figure 3.b,c). Cependant, la GTP peut recommencer à s'ajouter à l'extrémité (+), créant un nouveau capuchon. L'ensemble de ces phénomènes de polymérisation / dépolymérisation est appelé « l'instabilité dynamique » (Mitchison et al., 1984; Ohi et al., 2016).

Cette instabilité dynamique est notamment régulée par l'interaction avec des protéines associées aux microtubules (MAPs). Parmi ces protéines nous trouvons des protéines structurales, distribuées tout au long du microtubule, telles que la protéine Tau, responsable de la stabilité des MTs, des protéines liées aux extrémités (-) et (+), et des moteurs protéiques tels que la dynéine et la kinésine (Goodson & Jonasson, 2018).

Leur structure, leur dynamique et leurs protéines associées les conduisent à assurer une variété de fonctions. En effet, les microtubules sont les principales plateformes pour le transport intracellulaire à longue distance (Vale, 2003). Avec leur longueur allant de 1  $\mu\text{m}$  à plus de 100  $\mu\text{m}$  et leur largeur d'environ 25 nm (Ledbetter et al., 1963), ils sont considérés comme « les autoroutes » du transport intracellulaire (Goodson & Jonasson, 2018) et notamment le transport des filaments intermédiaires (Figure 5) (Leube et al., 2017). Les microtubules jouent aussi un rôle primordial dans la division cellulaire (mitose et méiose) (Fededa et al., 2012; Petry, 2016), dans le maintien de la forme de la cellule (Brown et al., 1996), dans la mécanotransduction à travers leurs interactions avec l'actine et leur influence sur l'adhérence et la migration des cellules (Seetharaman et al., 2022), ainsi que dans le positionnement des noyaux lors de la myogenèse. Ce dernier point sera détaillé à la partie « Myogenèse » (Azevedo et al., 2020).

Notons que les microtubules sont moins dynamiques et ont une rigidité du même ordre de grandeur que les filaments d'actine (Gittes et al., 1993; Hawkins et al., 2010; Howard, 2001).

### 2.1.3. *Filaments intermédiaires :*

Contrairement aux microfilaments et aux microtubules, les Filaments Intermédiaires (FIs) ne se composent pas de protéines globulaires, mais de monomères fibrillaires et insolubles (Robert et al., 2016). Ces monomères sont polarisés avec une extrémité N-terminal (tête) et une

extrémité C-terminal (queue) (Figure 4.a) (Chernyatina et al., 2015; T. A. Smith et al., 2002). Deux monomères se lient en spirale pour former un dimère en super hélice (Figure 4.b) (T. A. Smith et al., 2002). Deux dimères se lient entre eux de façon décalée et antiparallèle pour former un tétramère non polarisé, contrairement aux microfilaments et aux microtubules qui le sont (Figure 4.c). Puis, 8 tétramères se regroupent pour former un filament unitaire (Figure 4.d) (Sokolova et al., 2006). Plusieurs de ces filaments unitaires s'agrègent pour former un filament intermédiaire (Figure 4.e). Ce dernier se compacte pour avoir une longueur de 240 nm et un diamètre d'environ 10 nm (Mücke et al., 2004), ce qui lui vaut son nom puisque son diamètre est intermédiaire entre celui des microfilaments (7-8 nm) et les microtubules (24 nm).

Les filaments intermédiaires sont répertoriés en 6 classes en fonction de leur structure et de leur séquence d'acides aminés (Szeverenyi et al., 2008). Les classes I et II sont celles des kératines, appelées respectivement acides et basiques. Associées entre elles sous forme d'homo- ou d'hétérodimères, elles forment les cytokératines dans les cellules épithéliales. La classe III est composée de 4 protéines qui peuvent également former des homo- ou des hétérodimères. On retrouve la vimentine essentiellement présente dans les fibroblastes, les leucocytes et les cellules endothéliales, la desmine dans les cellules musculaires, la protéine acide de la neuroglie dans les cellules gliales et la périphérie dans les neurones périphériques. La classe IV est constituée de neurofilaments distribués le long des axones. La classe V est celle des lamines, localisées exclusivement dans le noyau. La classe VI correspond aux filaments perlés présents dans les yeux et la nestine.

Tout comme les autres sous-systèmes du cytosquelette, les FIs sont associés à beaucoup de protéines qui, en plus de leur structure et leurs réseaux, les aident à assurer leurs fonctions. En effet, les FIs représentent un ancrage pour différents organites cellulaires comme les mitochondries et les noyaux (Dupin et al., 2011; Matveeva et al., 2015). En plus, contrairement aux microfilaments et aux microtubules, ces structures sont très souples et peuvent supporter des déformations allant jusqu'à 300% leur taille (Sanghvi-Shah et al., 2017). De ce fait, ils contribuent fortement à la résistance mécanique au sein de la cellule (N. Wang et al., 2000). Par ailleurs, les FIs interagissent avec les plakines au niveau des desmosomes pour assurer l'adhérence cellule-cellule et des hémidesmosomes pour assurer les adhérences cellule-matrice (Desai et al., 2009).



## Intermediate filament assembly

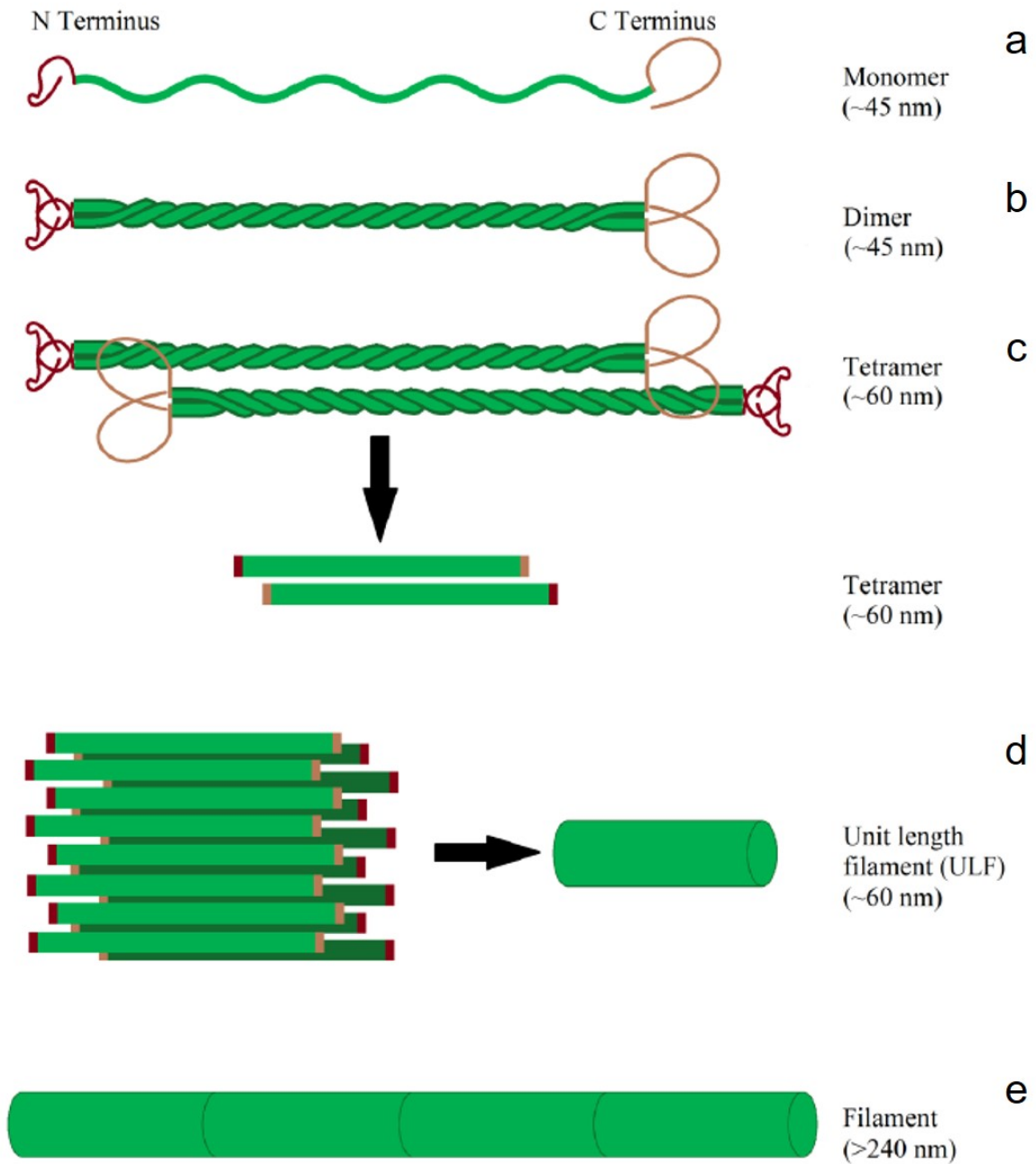


Figure 4 : **Illustration de l'assemblage d'un filament intermédiaire.** Les filaments intermédiaires proviennent des monomères qui s'enroulent pour former des dimères. Deux dimères se regroupent en un tétramère. Puis, huit tétramères s'assemblent pour former un filament de longueur unitaire. Les filaments unitaires forment le filament final par agrégation de bout en bout. Ce processus est notamment indépendant de l'ATP ou du GTP (Hohmann & Dehghani, 2019).

De plus, de récentes études ont montré l'existence d'un rôle crucial des FIs dans la mécanotransduction (Keeling et al., 2017). Notons que les FIs sont moins dynamiques que les filaments d'actines ou les microtubules. D'ailleurs, le transport des FIs est assuré par les protéines motrices associées aux microtubules comme la kinésine et la dynéine, ou encore celle

associée aux filaments d'actine comme la myosine (Figure 5) (Leube et al., 2017). En ce qui concerne la rigidité des FIs, elle se situe dans le même ordre de grandeur que celle des filaments d'actine et des microtubules, à savoir le GPa (Ikai, 2016).

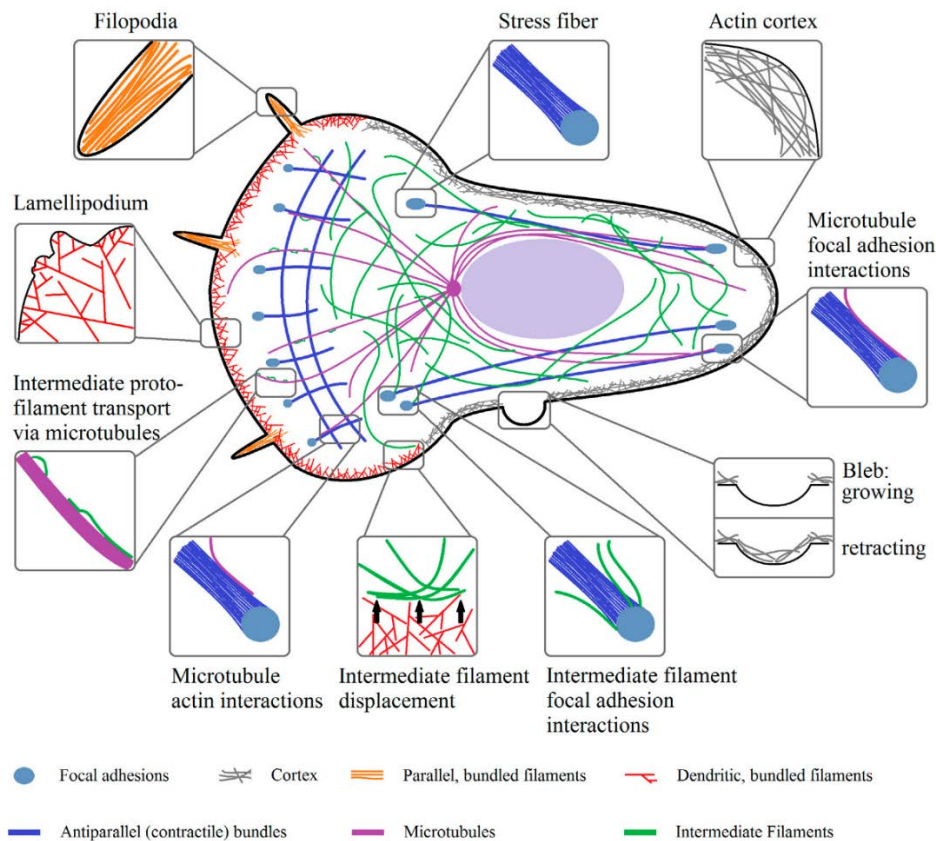


Figure 5 : Représentation graphique montrant les structures organisées du cytosquelette d'actine, des microtubules et des filaments intermédiaires, ainsi que leurs interactions physiques à l'intérieur de la cellule. Ces 3 protéines cytosquelettiques interagissent directement entre-elles (Hohmann & Dehghani, 2019).

#### 2.1.4. Pathologies liées à la structure du cytosquelette et ses protéines associées :

Au regard de l'implication du cytosquelette dans les grands processus cellulaires, beaucoup d'études se sont attachées à mettre en lumière le lien entre pathologie et structure du cytosquelette et de ses protéines associées (Ramaekers et al., 2004). Nous pouvons citer quelques exemples de maladies liées à des mutations génétiques de gène codant pour des protéines du cytosquelette, comme les desminopathies. Elles sont causées par des mutations affectant le gène codant pour la desmine et qui conduit souvent à l'accumulation de cette protéine en agrégats (Agnetti et al., 2022; Charrier et al., 2018; Paulin et al., 2004). On retrouve également les actinopathies musculaires liées à des mutations qui touchent les gènes codants pour l'actine  $\alpha$  (Clarkson et al., 2004) et les maladies dues à des désordres qui touchent la



kératine (Knöbel et al., 2015; Zatloukal et al., 2004). D'autres pathologies dues à des défauts de certaines protéines associées au cytosquelette ont été décrites telles que les dystrophies musculaires (Spence et al., 2002), les cancers (Ong et al., 2020) ou encore les maladies neurodégénératives. Par exemple, la maladie d'Alzheimer est due à une accumulation de la protéine Tau associée aux MTs (Bamburg et al., 2009), tandis que la maladie de Parkinson est fortement liée au MTs (Pellegrini et al., 2017).

## 2.2. Propriétés mécaniques en biologie :

Depuis le début de l'histoire de l'humanité, les matériaux ont tenu une place importante dans le quotidien de l'Homme. Ils ont été principalement utilisés pour fabriquer de nombreux objets tels que des outils, des armes, des ustensiles, des abris, des objets de décoration voire des bijoux. Au fil du temps, leurs propriétés n'ont cessé d'évoluer en devenant par exemple plus résistants ou plus intelligents avec pour objectif qu'ils confèrent de nouvelles fonctionnalités aux objets qui nous entourent. L'impact des matériaux dans l'histoire est tel que les historiens sont allés jusqu'à nommer certaines périodes historiques en fonction de la nature du matériau principalement utilisé dans la période concernée. A titre d'exemple, nous pouvons citer les périodes de « l'âge de pierre », « l'âge du cuivre », « l'âge du bronze » et « l'âge du fer » (Hummel, 2005). Dans la perspective de développer des matériaux toujours plus performants pour permettre de nouvelles applications, la nécessité de décrire leur nature, leur composition et leurs caractéristiques physico-chimique et mécanique est devenue cruciale. Parmi ces différents paramètres, nous nous focaliserons sur les propriétés mécaniques qui affectent la réponse d'un matériau lorsque celui-ci est soumis à une charge. La branche de la mécanique qui étudie le lien entre les contraintes appliquées et les déformations engendrées dans le matériau pour en déduire ses propriétés mécaniques est la mécanique des milieux continus. Dans ce contexte, les matériaux sont modélisés comme une masse continue plutôt que comme des particules discrètes. Ces modèles ont été proposés pour la première fois par le mathématicien français Augustin-Louis Cauchy (Drapaca et al., 2019). Par ailleurs, certains matériaux présentent la particularité d'avoir un comportement à la fois solide et fluide. Pour décrire leur comportement, une branche de la mécanique des milieux continus a été développée qui est appelée la rhéologie, du grec « rheo » pour « flux » et « logia » pour étude. Ce domaine permet de déterminer les propriétés élastiques, visqueuses et plastiques des matériaux (Schowalter, 1978). Plus récemment, aux yeux des mécaniciens, les tissus biologiques et les cellules ont été appréhendés comme des matériaux dont il est possible de caractériser leurs propriétés mécaniques et structurelles. Cette partie du mémoire est dédiée à ces nouvelles

applications en biologie. Pour ce qui suit, nous considérons que nous sommes en régime linéaire élastique.

### 2.2.1. *Contrainte* :

La contrainte, notée  $\sigma$  et appelée « stress » en anglais, est une grandeur physique qui décrit une force appliquée par unité de surface et qui provoque une déformation suivant l'expression (Moebs et al., 2016) :

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (1)$$

Où :

- $\sigma$  : Contrainte en Pascal (Pa), l'équivalent d'un newton par mètre carré (N / m<sup>2</sup>).
- F : Force appliquée (N).
- A : Surface de la coupe transversale déformée (m<sup>2</sup>).

De façon générale, il existe principalement 5 types de contraintes mécaniques (Figure 6) : Les contraintes normales (contraintes de traction et de compression), de cisaillement, de flexion (bending stress) et de torsion (torsion stress). Les deux dernières étant des composantes des 3 premières (Keating et al., 2021).

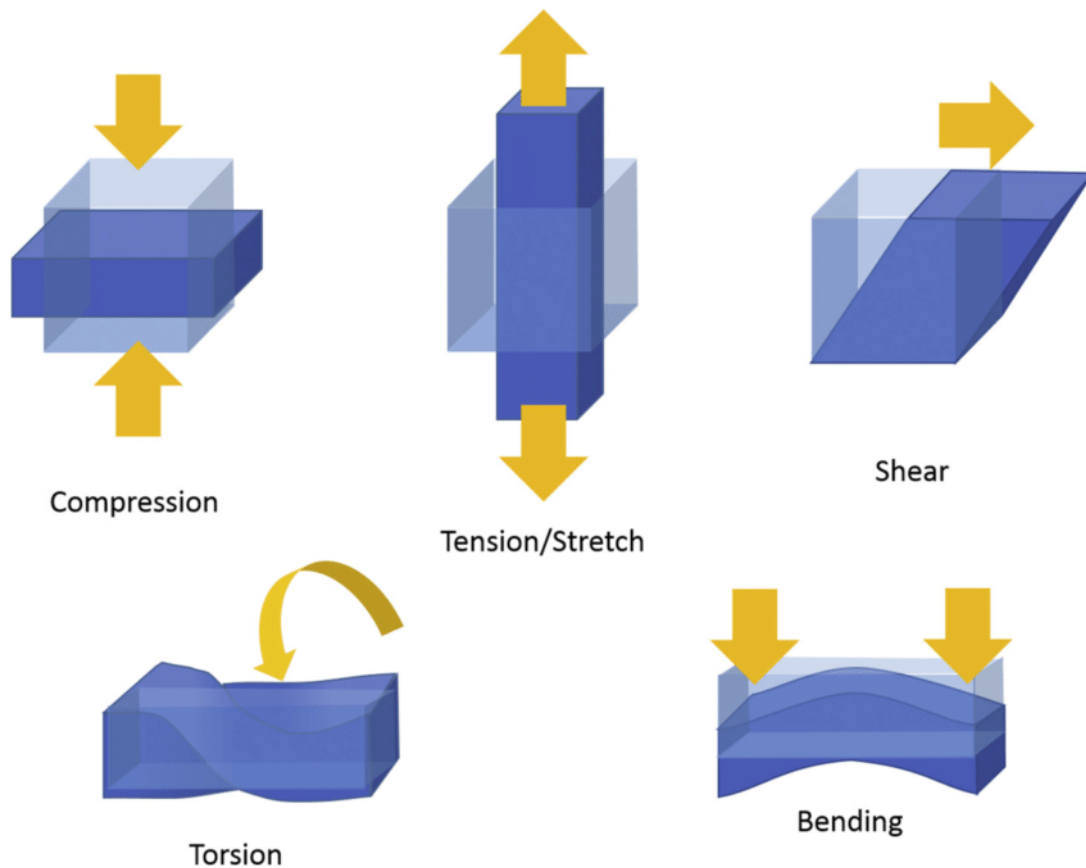


Figure 6 : Schéma illustrant les cinq types de contraintes qui déforment les matériaux. (Keating & Cullen, 2021).

En considérant plus spécifiquement la contrainte normale (Figure 6 ; Figure 7a et b) ainsi que l'équation (1), il est à noter que plus la force est petite et/ ou plus la section est grande plus la contrainte est petite. Par ailleurs, lorsqu'une même force  $F$  est appliquée sur deux sections respectivement de surface  $A$  et  $4A$ , la contrainte appliquée sur la section de surface  $4A$  est 4 fois plus petite que sur la section de surface  $A$ . Dans ce type d'essai en condition idéale, la force appliquée est perpendiculaire à la surface, ce qui n'est pas toujours vérifié. Dans le cas plus général, la contrainte peut se décomposer en une composante normale et une composante de cisaillement, comme on peut le voir sur la Figure 6.

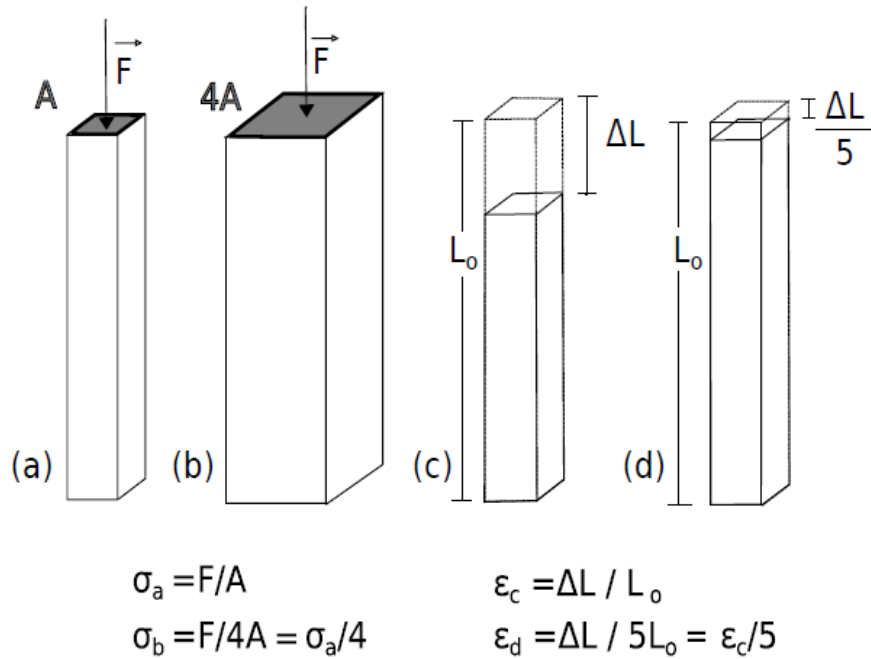


Figure 7 : Illustration des relations de contrainte et de déformation. (a) F est appliquée sur la zone A suivant la direction normale. (b) F est appliquée suivant la direction normale sur une zone quatre fois plus grande (4A) que dans le cas (a). (c) et (d) illustrent différentes déformations pour une contrainte fixe (Streppa, 2017).

### 2.2.2. La déformation :

La contrainte appliquée sur un matériau est liée à sa déformation. Cette dernière correspond à une variation de forme ou de taille d'un corps soumis à une force externe due à des changements de distance entre les différentes particules du matériau. Elle est généralement décrite comme le rapport entre la variation de la longueur du matériau et sa longueur initiale suivant la relation :

$$\epsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \quad (2)$$

Où :

- $\epsilon$  : déformation, sans dimension.
- $\Delta l$  : changement de longueur du matériau en mètre (m).
- $l_0$  : longueur initiale du matériau en mètre (m).

Comme le montrent les Figure 7.c et Figure 7.d, si nous appliquons la même contrainte (c'est-à-dire la même force sur la même surface) sur 2 matériaux différents (par exemple de l'acier et du plastique), les déformations engendrées seront différentes (Streppa, 2017).

### 2.2.3. Rigidité et viscoélasticité :

De manière générale, l'ensemble des essais mécaniques est analysé en modélisant la relation contrainte-déformation pour en extraire les propriétés mécaniques du matériau testé. Parmi ces propriétés nous pouvons citer le module de Young ( $E$ ). Il caractérise la rigidité d'un matériau, il est d'ailleurs appelé module d'élasticité. Il peut être calculé en soumettant un matériau à une contrainte uniaxiale de compression ou de traction, puis en mesurant la déformation. A faibles déformations, la réponse mécanique contrainte-déformation peut être considérée comme linéaire (Figure 8). Cependant, à des déformations plus importantes, un comportement non linéaire peut se produire qui peut conduire à des ruptures locales (Figure 8). Le module d'élasticité, qui correspond à la pente de la partie linéaire de la courbe contrainte-déformation, est généralement mesuré à des valeurs de déformation inférieures à 0,2% dans le cas de matériaux solides (Guimarães Carlos F, 2020; Marae-Djouda, 2016).

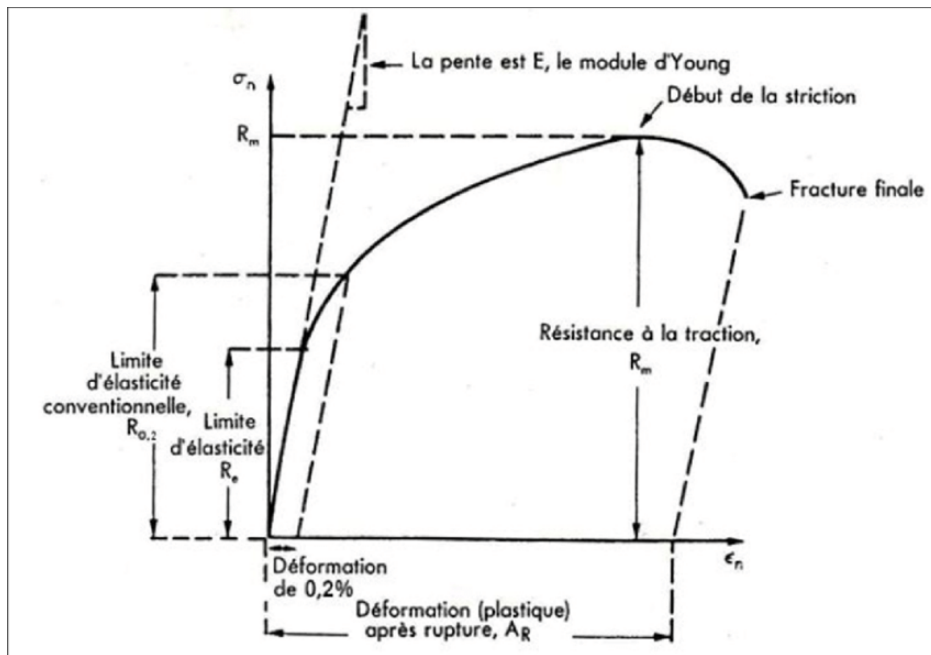


Figure 8 : Courbe de traction conventionnelle et définition de quelques grandeurs classiques (Marae-Djouda, 2016).

Par ailleurs, les tissus vivants ont été décrits d'un point de vue mécanique comme des matériaux viscoélastiques. La caractérisation mécanique de ce type de matériau se fait notamment grâce à des tests mécaniques dépendant du temps, dont le principe consiste à appliquer soit une déformation et de mesurer la force requise en fonction du temps (relaxation des contraintes) soit une contrainte et de mesurer la déformation sous forme de changements dans la forme (fluage) en fonction du temps (Figure 9) (Wilkes, 2003) Pour décrire la relation contrainte-

déformation issue de ces différents tests et prédire le comportement des matériaux viscoélastiques, différents modèles rhéologiques ont été développés.

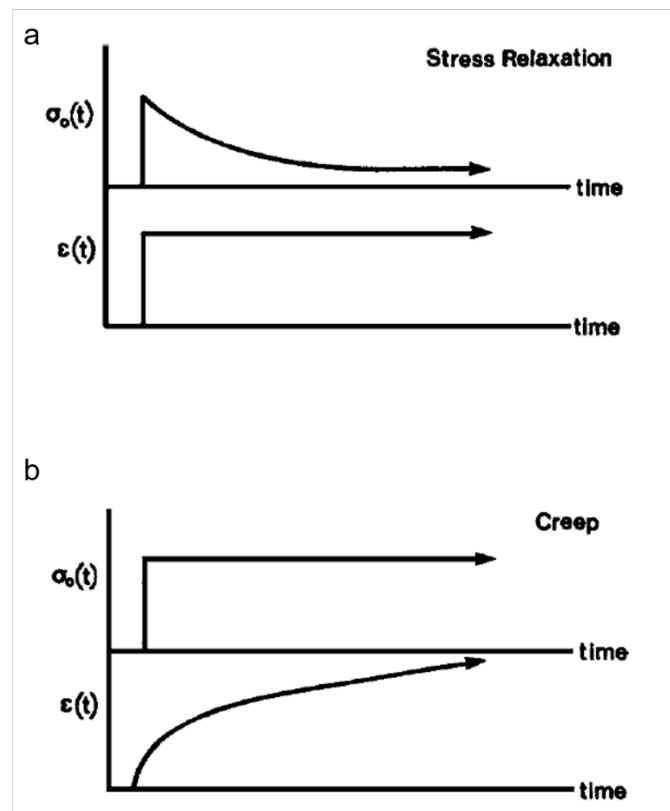


Figure 9 : Comportement général de la contrainte et de la déformation en fonction du temps pour les tests de relaxation (a) et de fluage (b). (Wilkes, 2003)

#### 2.2.4. Modèles rhéologiques :

Les modèles rhéologiques sont des outils mathématiques utilisés pour décrire et prédire le comportement des matériaux viscoélastiques. Ces modèles permettent de représenter les propriétés mécaniques complexes des matériaux qui présentent à la fois des caractéristiques élastiques et visqueuses tels que les tissus biologiques. Différents modèles rhéologiques ont été développés pour représenter différentes formes de réponse viscoélastique, allant des modèles simples aux modèles plus sophistiqués.

Parmi les modèles rhéologiques les plus couramment utilisés, on retrouve les modèles de Maxwell, de Kelvin-Voigt, de Burgers, de Zener, et de Maxwell généralisé (Figure 10). Chacun de ces modèles repose sur une combinaison de ressorts (composante élastique) et d'amortisseurs (composante visqueuse) pour représenter les comportements élastique et visqueux du matériau (Fung, 2013; Yenilmez et al., 2017).

Model	Maxwell	Kelvin-Voigt	Zener	Burgers	Generalized Maxwell
Mechanical Analogue					
System Equations	$\begin{bmatrix} c_1 & -c_1 \\ -c_1 & c_1 \end{bmatrix} \begin{Bmatrix} \dot{\varepsilon}_1 \\ \dot{\varepsilon}_2 \end{Bmatrix} + \begin{bmatrix} E_1 & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{Bmatrix} \text{sign}(\varepsilon_1)  \varepsilon_1 ^{m_1} \\ \varepsilon_2 \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} 0 \\ \sigma \end{Bmatrix}$	$\dot{\varepsilon} = \frac{\sigma - E_0 \varepsilon^m}{c_1}, \quad \varepsilon \geq 0$	$\begin{bmatrix} c_1 & -c_1 \\ -c_1 & c_1 \end{bmatrix} \begin{Bmatrix} \dot{\varepsilon}_1 \\ \dot{\varepsilon}_2 \end{Bmatrix} + \begin{bmatrix} E_1 & 0 \\ 0 & E_0 \end{bmatrix} \begin{Bmatrix} \text{sign}(\varepsilon_1)  \varepsilon_1 ^{m_1} \\ \text{sign}(\varepsilon_2)  \varepsilon_2 ^{m_0} \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} 0 \\ \sigma \end{Bmatrix}$	$\begin{bmatrix} c_1 & -c_1 & 0 \\ -c_1 & c_1 + c_2 & 0 \\ 0 & -c_2 & c_2 \end{bmatrix} \begin{Bmatrix} \dot{\varepsilon}_1 \\ \dot{\varepsilon}_2 \\ \dot{\varepsilon}_3 \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} -F_1 \text{sign}(\varepsilon_1)  \varepsilon_1 ^{m_1} \\ F_2 \text{sign}(\varepsilon_3 - \varepsilon_2)  \varepsilon_3 - \varepsilon_2 ^{m_2} \\ -F_2 \text{sign}(\varepsilon_3 - \varepsilon_2)  \varepsilon_3 - \varepsilon_2 ^{m_2} \end{Bmatrix}$	$\begin{bmatrix} c_1 & 0 & \dots & 0 & -c_1 \\ 0 & c_2 & & 0 & -c_2 \\ \vdots & & \ddots & & \vdots \\ 0 & 0 & & c_n & -c_n \\ -c_1 & -c_2 & \dots & -c_n & \sum_{i=1}^n c_i \end{bmatrix} \begin{Bmatrix} \dot{\varepsilon}_1 \\ \dot{\varepsilon}_2 \\ \vdots \\ \dot{\varepsilon}_n \\ \dot{\varepsilon} \end{Bmatrix} + \begin{bmatrix} E_1 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & E_2 & & 0 & 0 \\ \vdots & & \ddots & & \vdots \\ 0 & 0 & & E_n & 0 \\ 0 & 0 & \dots & 0 & E_0 \end{bmatrix} \begin{Bmatrix} \text{sign}(\varepsilon_1)  \varepsilon_1 ^{m_1} \\ \text{sign}(\varepsilon_2)  \varepsilon_2 ^{m_2} \\ \vdots \\ \text{sign}(\varepsilon_n)  \varepsilon_n ^{m_n} \\ \text{sign}(\varepsilon)  \varepsilon ^{m_0} \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} 0 \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \\ \sigma \end{Bmatrix}$

Figure 10 : Modèles mécaniques viscoélastiques et les équations du système correspondant (Yenilmez et al., 2017).

Dans notre étude, nous avons utilisé le modèle de Maxwell-Wiechert généralisé du second ordre (Figure 11) pour sa pertinence concernant la caractérisation de la relaxation des cellules soumises à une contrainte constante appliquée par microscopie à force atomique (Moreno-Flores et al., 2010).

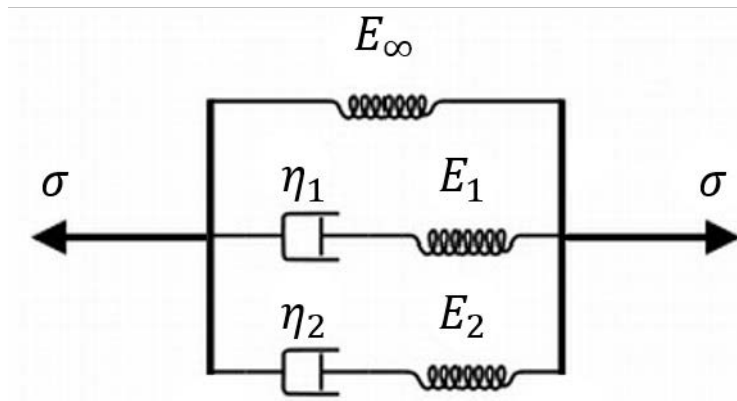


Figure 11 : Modèle de Maxwell-Wiechert généralisé du second ordre (Fereol et al., 2017)

### 2.2.5. Techniques de mesure des propriétés mécaniques des matériels biologiques :

Les premières études en biomécanique ciblaient plus spécifiquement les tissus tels que les muscles, la peau, les cartilages, les os et les poumons, en raison des limitations des technologies de mesure de l'époque (Fung, 2013; Hildebrandt, 1970). Au milieu des années 70 voire au début des années 80, les premières investigations en mécanique cellulaire ont porté sur la caractérisation des propriétés mécaniques des membranes des globules rouges via la technique d'aspiration par micropipette (Evans et al., 1976). Aujourd'hui, avec l'avènement de nouvelles technologies comme les microscopes à sonde locale (microscope à force atomique), les recherches en biomécanique se sont élargies et peuvent être réalisées de l'échelle subcellulaire à l'organe entier (Desprat, 2005) comme illustré sur la Figure 12.

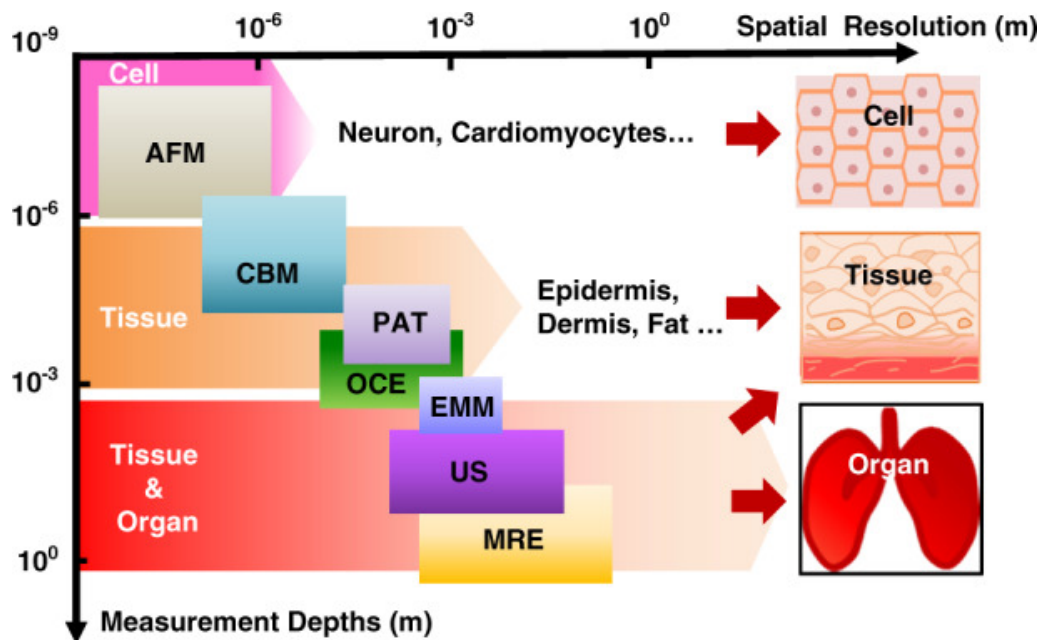


Figure 12 : Illustration des plages approximatives de profondeur de mesure et de résolution spatiale pour diverses cibles biologiques au moyen de différents types de méthodes d'évaluation, y compris la microscopie à force atomique (AFM), la mesure en cantilever (CBM), les techniques par actionneur/capteur piézoélectriques (PAT), élastographie par cohérence optique (OCE), capteurs du module électromécanique (EMM), techniques d'échographie (US) et élastographie par résonance magnétique (MRE) (Song et al., 2022).

Chacune des techniques mentionnées dans la Figure 12 présente des caractéristiques distinctes relatives aux résolutions temporelles et spatiales et aux gammes de forces qui peuvent être appliquées. Ainsi, le choix d'une technique expérimentale pour une étude donnée doit prendre en compte la spécificité du matériel biologique étudié.



En effet, ces techniques peuvent se diviser en méthodes mesurant les propriétés mécaniques à l'échelle microscopique (essentiellement orientés vers la cellule) et à l'échelle macroscopique (essentiellement orientés vers les tissus et les organes).

### 2.2.6. Propriétés mécaniques au niveau de la cellule :

Parmi les méthodes utilisées au niveau de la cellule, nous pouvons distinguer des techniques dites actives, c'est-à-dire qui appliquent des forces sur la cellule pour en mesurer les déformations engendrées, et des techniques dites passives qui détectent les forces développées par les cellules (Pritchard et al., 2014). Quelques-unes de ces différentes techniques de micromanipulation sont illustrées sur la Figure 13.

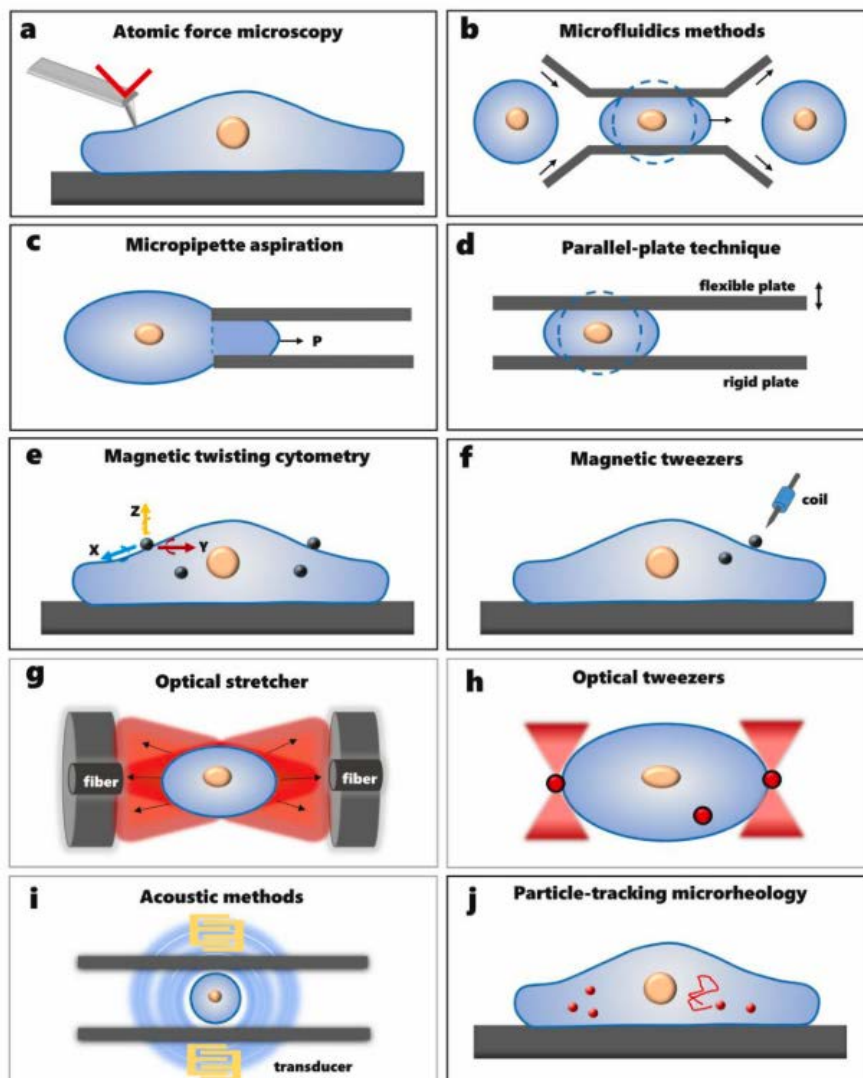


Figure 13 : Illustration schématique des différentes méthodes utilisées pour mesurer les propriétés mécaniques d'une seule cellule. (a) Microscope à force atomique (AFM). (b) méthodes microfluidiques (MMs). (c) Micropipette aspiration (MA). (d) Technique par plaques parallèles (PPT). (e) Cytométrie par torsion magnétique (MTC). (f) Pincés magnétiques (MT). (g)

*stretchers optiques (OS). (h) Pincés optiques (OT). (i) Méthodes acoustiques (MA). (j) Microrhéologie du suivi des particules (PTM). (Hao et al., 2020)*

Parmi ces différentes techniques dites actives, nous pouvons citer la microscopie à force atomique (Figure 13.a) utilisée pour la première fois sur les cellules en 1992 par Radmacher et al (Radmacher et al., 1992). Elle est considérée aujourd'hui comme l'un des outils incontournables dans l'évaluation des propriétés mécaniques des cellules. Les méthodes de micro-fluidiques (Figure 13.b) sont également largement utilisées pour caractériser la déformabilité et la résistance des cellules aux contraintes de cisaillement (Vanapalli et al., 2009). On trouve également l'aspiration par micropipette (Figure 13.c) qui permet de mesurer la déformation cellulaire en fonction de la pression appliquée pour en déduire des paramètres viscoélastiques (Guevorkian et al., 2017). D'autres techniques utilisées pour la caractérisation mécanique des cellules appliquent des contraintes mécaniques sur la cellule entière (technique des microplaques Figure 13.d) (Bufi et al., 2015), ou sur une partie de la cellule à l'aide de champs magnétiques (la magnétocytométrie, et les pincés magnétiques, Figure 13.e et Figure 13.f)(Puig-De-Morales et al., 2001), ou de pièges optiques (Stretchers optiques et les pincés optiques, Figure 13.g Figure 13.h) (Bustamante et al., 2021; Guck et al., 2001). D'autres techniques utilisent des ondes acoustiques (spectroscopie par force acoustique, Figure 13.i) (Sorkin et al., 2018).

Concernant, les techniques dites passives, nous pouvons citer la micro-rhéologie par suivi de particules, qui consiste à suivre le mouvement brownien de particules dans le cytoplasme d'une cellule (Figure 13.j), ou encore la microscopie à force de traction, qui consiste à collecter le champ de déplacement de microbilles fluorescentes intégrées dans un gel sur lequel les cellules adhèrent et exercent des forces, voire la technique des micro-piliers, etc.

Dans ce présent travail, nous avons utilisé le microscope à force atomique (AFM) comme outil de mesure des propriétés mécaniques des cellules.

a. Microscope à force atomique :

Le Microscope à Force Atomique ou AFM (Atomic Force Microscope) est un microscope à sonde locale inventé en 1986 (Binnig et al., 1986) qui utilise une sonde locale pour parcourir un échantillon afin d'en déduire certaines de ses propriétés de surface ou de structure à une résolution atomique. Contrairement à son précurseur le Microscope à Effet Tunnel découvert en 1981 (Binnig et al., 1982) qui n'est sensible qu'au courant électrique entre la sonde et l'échantillon, l'AFM n'est sensible qu'aux forces résultantes de l'interaction entre la sonde et l'échantillon. Cette spécificité lui permet de caractériser les propriétés de surface et de structure

des matériaux conducteurs mais aussi les matériaux isolants ou à faible conductivité tels que les matériaux biologiques (Hansma et al., 1988). En plus de cette caractérisation topographique, l'AFM peut être utilisé pour manipuler des molécules ou mesurer des forces. Ces mesures de forces (spectroscopie de force) peuvent être appliquées à l'étude des propriétés mécaniques de l'échantillon telles que la rigidité, la viscosité ou l'adhésion (Collinsworth et al., 2002).

- Principe du microscope à force atomique :

Le principe de mesure de l'AFM est présenté sur la Figure 14. Brièvement, l'AFM est constitué d'un bras de levier (cantilever) flexible assimilé à un ressort, de rigidité allant généralement de 0,01 N/m à 1 N/m, à l'extrémité duquel on trouve une pointe (généralement en silicium ou en nitrure de silicium) de géométrie variable de type sphérique, pyramidale à quatre faces, cylindrique voire de type plus complexe (ex : MLCT ou OBL de Bruker). Le mouvement de la sonde est contrôlé par des moteurs piézoélectriques. À l'approche de la surface de l'échantillon, les forces d'interactions (de contact ou non) entre la pointe et l'échantillon provoquent une déflexion du levier qui est détectée via un faisceau laser. En absence de déflexion, ce dernier, émis par une diode de façon permanente, est réfléchi sur l'extrémité du cantilever en direction du centre de quatre quadrants composés de photodiodes. Dès que le cantilever se défléchit, le faisceau laser est dévié du centre des 4 quadrants. Cette déviation est donc proportionnelle à l'intensité des forces mises en jeu entre la sonde et la surface de l'échantillon. Ainsi, le changement de coordonnées X, Y, Z du faisceau laser sur les 4 quadrants, mesuré en convertissant le signal photonique en signal électrique puis en nouvelles coordonnées, permet d'évaluer les forces d'interaction sonde-échantillon (AG JPK 2005) :

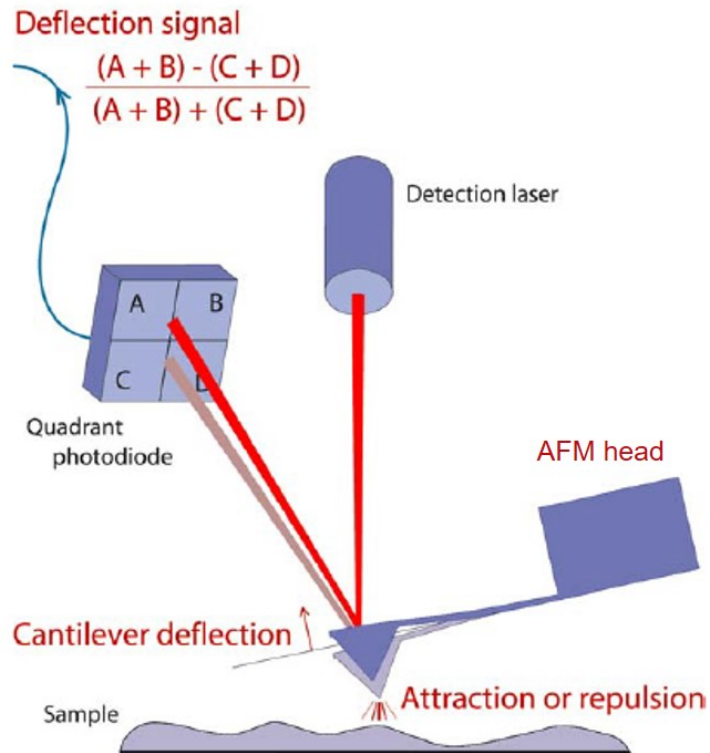


Figure 14 : Schéma du principe de l'AFM (Drolle et al., 2014).

- Méthode de la spectroscopie de force :

Cette méthode consiste, en chaque point testé, à mesurer la déflexion du levier due aux forces d'interaction entre la pointe et l'échantillon au cours d'une phase d'approche et de retrait de la pointe et d'enregistrer la position verticale  $h$  de la sonde. Ceci se fait en suivant les différentes étapes décrites sur la Figure 15. Au début de la phase d'approche (Figure 15.a), la pointe est suffisamment loin de la surface de l'échantillon pour qu'aucune interaction sonde-échantillon, et donc aucune déflexion du levier, n'ait lieu. La pointe est ensuite approchée de la surface de l'échantillon via les moteurs piézoélectriques jusqu'au contact (Figure 15.b). À partir du contact, plus la pointe pénètre dans l'échantillon plus les forces exercées sur la pointe sont grandes (Figure 15.c). Arrivée à un point de force maximale défini par l'utilisateur, la pointe commence à se retirer et les forces de répulsions diminuent (Figure 15.d). Au cours de cette rétraction, la courbe montre souvent une hystérésis due aux forces de viscosité et d'adhérence qui empêchent la pointe de se détacher de l'échantillon (Figure 15.e). Finalement, la pointe se décolle totalement de l'échantillon et les forces redeviennent nulles (Figure 15.f). Ainsi, une courbe représentant la déflexion en fonction de la position  $h$  du levier peut être tracée (Figure 15.B).

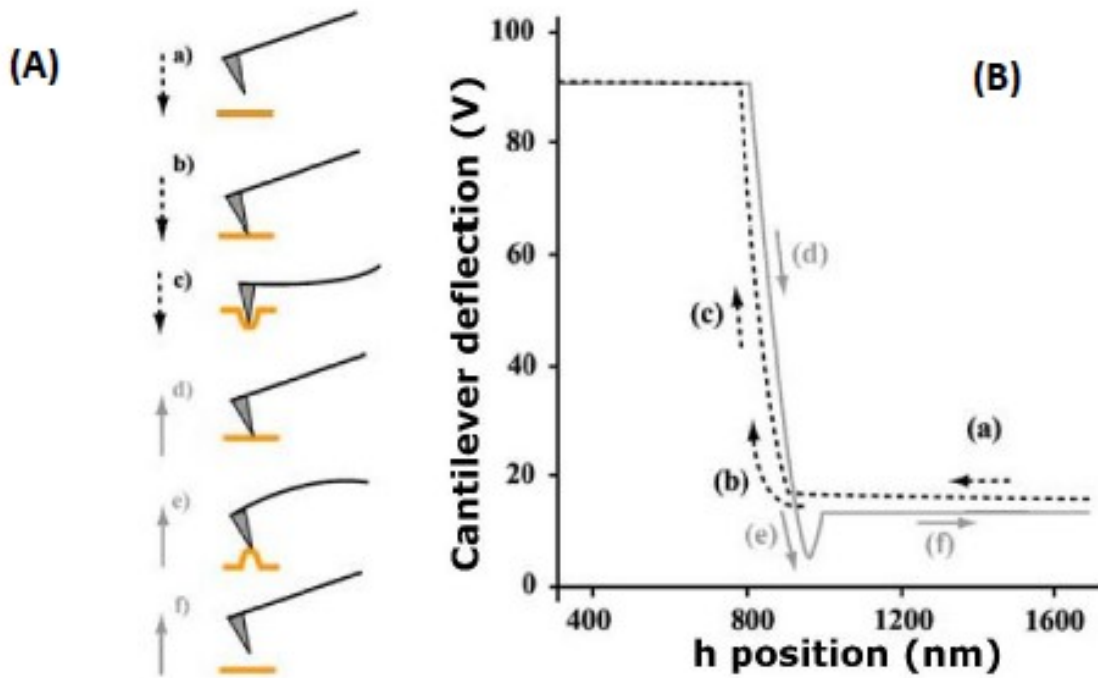


Figure 15 : En A) Schéma descriptif des phases d'approche et de retrait de la pointe AFM par rapport à la surface de l'échantillon. Dans le cas d'une courbe de force, la déflexion du cantilever est mesurée lorsque l'extrémité de la pointe AFM approche (A.a à A.c) et se rétracte (A.d à A.f) de la surface de l'échantillon. En B), Tracé de la déflexion du levier en fonction de la position verticale du piézo (position h). (B.a) Le cantilever part d'un point où il n'est pas en contact avec la surface. (B.b) Contact entre la pointe et la surface, (B.c) l'échantillon mou est indenté avec une force (voltage) contrôlée par l'utilisateur. (B.d) Le cantilever est rétracté après que la force souhaitée est atteinte. (B.e) Déflexion du levier due aux phénomènes d'adhérence de la pointe en raison de l'interaction avec l'échantillon jusqu'à ce que la force appliquée soit suffisante pour séparer l'extrémité de la surface (B.f) (Ludwig et al., 2008)

En considérant que le levier est assimilé à un ressort de constante de raideur  $k$ , la loi de Hooke propose une relation entre la force mesurée et la déflexion du levier :

$$F = k \cdot d \quad (1)$$

En utilisant cette relation, il est facile de transcrire la courbe déflexion-position du levier en une courbe montrant l'évolution de la force en fonction de la position du levier.

Pour déduire de cette courbe force-hauteur les propriétés mécaniques locales de l'échantillon, un modèle théorique dépendant de la forme géométrique de l'indenteur (explicité dans le paragraphe ci-dessous) est ajusté à la courbe expérimentale.

Dans le cas d'un indenteur sphérique, cette équation est :

$$F = \frac{4}{3} \cdot \frac{E}{1 - \nu^2} \cdot \sqrt{R_t} \cdot \delta^{\frac{3}{2}} \quad (2)$$

Où :

F : Force d'indentation

E : Module de Young

$\nu$  : Coefficient de Poisson

$R_t$  : Le rayon de la sonde sphérique

$\delta$  : La profondeur d'indentation

Dans le cas d'un indenteur pyramidal, cette équation est selon Bilodeau (Bilodeau GG, 1992) :

$$F = \frac{3}{4} \cdot \frac{E}{1 - \nu^2} \cdot \delta^2 \cdot \tan(\alpha) \quad (3)$$

Où  $\alpha$  est le demi angle d'ouverture de la pointe pyramidale.

- Applications du microscope à force atomique (AFM) :

À l'origine, l'AFM a été inventé pour permettre l'exploration de différents d'échantillons de taille nanométrique. Après cela, son application s'est étendue à divers types d'échantillons, en particulier les échantillons biologiques, au-delà de ce que permettait le microscope à effet tunnel, qui lui, ne pouvait être appliqué que sur les matériaux conducteurs. Cette compatibilité de l'AFM, sa versatilité ainsi que son coût moyen ont contribué à son adoption rapide dans un large éventail de domaines et d'applications. Nous proposons ici de présenter quelques applications dans les domaines de la physique et des sciences des matériaux, des nanotechnologies et de la biologie (Eaton et al., 2010).

Concernant, les applications en physique, l'AFM est principalement utilisé pour étudier les structures des matériaux organiques ou inorganiques isolants à grande résolution. Il peut être employé pour étudier la rugosité à l'échelle nanométrique de matériaux à haute performance tels que le titane utilisé dans les applications biologiques (Lamolle et al., 2009). Il a également été utilisé pour étudier la rigidité de films de polymères (Vanlandingham et al., 1997) ainsi que des structures cristallines (Maier et al., 2007).

Pour ce qui est des applications en nanotechnologie, l'AFM peut non seulement réaliser des mesures électriques, magnétiques, mécaniques à l'échelle nanométrique, mais il peut aussi altérer et construire des structures nanométriques (Xie et al., 2006). Pour l'exemple, il peut

mesurer les propriétés de nanoparticules, comme les quantum dots (Fu et al., 2002) ou construire des outils nanométriques (Meltzer et al., 2001).

Cependant, le domaine d'application qui nous intéresse plus spécifiquement dans le cadre de ce travail est le domaine de la caractérisation des milieux biologiques. A ce propos, il est à noter qu'aujourd'hui quasiment tous les fabricants d'AFM proposent des modèles orientés vers les applications biologiques. Ceci est dû au fait que celui-ci peut être utilisé dans des conditions proches des conditions physiologiques, à savoir en milieu liquide et à température contrôlée (Eaton & West, 2010). L'AFM sert à imager ou à mesurer les propriétés mécaniques ou physiques de biomolécules, telles que des carbohydrates (Tromas et al., 2001), ou des protéines voire des complexes protéiques (Müller et al., 2002). Il permet de déplier des protéines et d'en déduire les forces mises en jeu dans le maintien de la structure tridimensionnelle de la protéine (Mitsui et al., 1996). Il est largement utilisé pour mesurer les propriétés mécaniques et évaluer la topographie des cellules associées. En effet, à chaque courbe de force, le point de contact est mesuré (Rigato, 2015). Il a également été utilisé dans sa version ultrarapide pour imager le comportement dynamique de protéines en temps réel (Kodera et al., 2020; Kodera et al., 2010)

Même si ces domaines couvrent la majorité des applications de l'AFM, il en subsiste quelques unes qui n'appartiennent à aucun domaine comme les applications de l'AFM en géologie (Nagy et al., 1994), en astro-géologie (Steele et al., 1998) et même dans la conservation de pièces d'art (Stuart, 2007).

b. Relation cytosquelette – propriétés mécaniques de la cellule :

Comme nous l'avons énoncé précédemment à travers plusieurs exemples, le cytosquelette, de par sa structure en réseau, sa dynamique de remodelage et ses protéines associées, assure plusieurs fonctions vitales au sein de la cellule. Ces fonctions peuvent être catégorisées en 3 grandes fonctions : Il organise spatialement les organites de la cellule comme par exemple le déplacement intracellulaire des organelles ; il relie la cellule physiquement et biochimiquement à l'environnement externe en assurant notamment la mécanotransduction (Orr, 2006) ; et il génère des forces coordonnées qui permettent à la cellule de se déplacer et de changer de forme, phénomène retrouvé notamment lors de la migration (Daniel A Fletcher et al., 2010). Ces fonctions cellulaires sont donc toutes liées directement ou indirectement à des processus mécaniques et physiques (notions de forces, transport, mouvement, résistance... etc.). De ce fait, il est aisé d'envisager que ce réseau de biopolymères interconnectés joue un rôle primordial dans les propriétés mécaniques de la cellule (Kasas et al., 2005; Pegoraro et al., 2017). Afin de mettre en évidence cette contribution, de nombreuses études ont été menées depuis les années

2000 dont la méthodologie repose sur la mesure des propriétés mécaniques cellulaires à l'aide d'outils de micromanipulation (Magnétocytométrie, pince optique, etc.) avec et sans drogues modulant le cytosquelette (ex : la cytochalasine D et la latrunculine A pour dépolymériser les filaments d'actines ; le nocodazole pour dépolymériser les microtubules et le taxol pour l'en empêcher). Nous pouvons citer quelques études, dont celle de N. Wang qui a montré qu'en appliquant un perturbateur des filaments intermédiaires comme l'acrylamide, la rigidité et la viscosité de la cellule diminuait respectivement de 15% et 10% minimum (N. Wang, 1998). Une autre étude a montré que l'inhibition de la polymérisation des microtubules par le nocodazole avait significativement augmenté la force générée par les muscles lisses (Paul et al., 2000). Par ailleurs, il a été observé que l'altération de la polymérisation de l'actine par la cytochalasine D diminuait drastiquement la rigidité et la force de contraction des cellules (Puttini et al., 2009; Wakatsuki et al., 2001; N. Wang, 1998). Cette relation entre les propriétés mécaniques des cellules et les protéines du cytosquelette ne se limite pas à ces dernières mais s'étend aussi à leurs protéines associées ou moteurs protéiques. En effet, il a été montré que l'inhibition de la myosine II non-musculaire par la blebbistatine diminuait fortement la force et la rigidité de la cellule (Martens et al., 2008).

En parallèle des techniques utilisées au niveau de la cellule, d'autres techniques sont utilisées pour caractériser les propriétés mécaniques aux niveaux des tissus ou des organes.

#### **2.2.7. Propriétés mécaniques au niveau du tissu : Elastographie Ultrasonore**

Parmi les techniques les plus récentes utilisées pour l'évaluation des propriétés mécaniques au niveau des tissus ou des organes, on retrouve les micro-cantilevers personnalisés. Ceux-ci mesurent la rigidité des tissus mais aussi des cellules à des résolutions microscopiques ( $10^{-6}$  à  $10^{-5}$  m) en utilisant des micro-cantilevers spécialement conçus. Nous trouvons également les PAT (Techniques de capteur/actionneur piézoélectrique) qui sont des détecteurs piézoélectriques. Ils utilisent des microsystèmes minces et flexibles pour mesurer la rigidité des tissus à des profondeurs proches de la surface ( $10^{-5}$  à  $10^{-4}$  m). A une échelle plus grande, il existe les OCE (élastographie par cohérence optique). Cette technique caractérise la rigidité des tissus profonds dont la profondeur de pénétration est  $> 1$  mm en se basant sur des techniques d'imagerie optique. L'EMM (Mesure du module électromécanique) quant à elle mesure in vivo les paramètres mécaniques des tissus mous à des profondeurs de mesure allant de  $10^{-3}$  à  $10^{-2}$  m. L'élastographie par ultrasons, elle, utilise des ondes ultrasonores (US) pour mesurer la rigidité des tissus et des organes à des profondeurs de l'ordre de  $10^{-1}$  m. L'élastographie par résonance



magnétique (MRE) cartographie la rigidité et la texture des tissus et des organes à des profondeurs allant jusqu'à  $10^0$  m (Voir Figure 12) (Song et al., 2022).

Dans cette étude, nous avons mesuré les propriétés mécaniques au niveau tissulaire qui a été réalisée grâce à la technique d'élastographie. C'est une technique d'imagerie médicale non-invasive qui sert à cartographier les propriétés mécaniques (la rigidité) des tissus biologiques. Ainsi, elle permet de différencier les tissus mous des tissus rigides à des fins de diagnostic (Sarvazyan et al., 2011). Cette technique, inspirée de la palpation pratiquée depuis les traditions pharaonique et chinoise a été développée au 20<sup>ème</sup> siècle par la médecine occidentale (Wells et al., 2011). En 1991, le Dr Jonathan Ophir a ainsi permis de passer d'une technique qualitative à une technique quantitative (Ophir et al., 1991). Les techniques d'élastographie s'appuient sur un processus en 3 étapes qui consistent d'abord à induire une distorsion ou une déformation du tissu, puis à détecter la réponse de ce tissu et enfin à analyser cette réponse. On trouve ainsi différents types de techniques caractérisés par plusieurs critères. Le premier est la nature de l'excitation mécanique appliquée sur le tissu, à savoir une compression statique ou une vibration monochromatique ou transitoire. Le deuxième est la façon dont ces excitations sont générées (internes ou externes). Puis le troisième correspond aux modalités d'imagerie du déplacement résultant des tissus (Jérémy Bercoff et al., 2004). Ainsi, nous distinguons deux grandes familles de techniques d'élastographie : l'élastographie par ultrasons et l'élastographie par résonance magnétique. Parmi les techniques d'élastographie ultrasonore, nous pouvons citer, la sonoélasticité, la vibro-acousto-graphie, l'ARFI (Acoustic Radiation Force Imaging), la SDUV (Shear Dispersion Ultrasound Vibrometry), et l'élastographie par ondes de cisaillement SWE (Shear Wave Elastography). Dans ce dernier cas, la détection de la vitesse de propagation de l'onde de cisaillement induite permet d'en déduire une cartographie de la rigidité des tissus

(Tang et al., 2015). En effet, la vitesse de l'onde de cisaillement est reliée au module de cisaillement par la relation suivante (Sigrist et al., 2017) :

$$C_s = \sqrt{\frac{G}{\rho}} \quad (4)$$

Où,  $C_s$  est la vitesse de propagation de l'onde de cisaillement (m/s),  $G$  le module de cisaillement (Pa) et  $\rho$  la densité du matériau ( $\approx 1000 \text{ kg/m}^3$  en biologie).

Sachant que :

$$E = 2(\nu + 1) \cdot G \quad (5)$$

Où  $E$  est le module de Young,  $\nu$  le coefficient de Poisson. Du fait de sa forte teneur en eau, un tissu biologique, et plus spécifiquement le muscle, est considéré comme un milieu quasi-incompressible. (Böl et al., 2014), ce qui se traduit par un coefficient de poisson égal à 0.5 (Hug et al., 2015).

L'équation (5) peut donc s'écrire :

$$E \approx 3G = 3\rho C_s^2 \quad (6)$$

Des études ont d'ailleurs montré que, quand la sonde à ultrasons est parallèle aux fibres musculaires (dans le cas d'étude d'un muscle), et malgré l'anisotropie de ces dernières, la relation entre  $G$  et  $E$  est quasiment linéaire (Eby et al., 2013).

Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé une technique d'élastographie dynamique appelée élastographie par onde de cisaillement supersonique (Supersonic Shear wave Imaging, SSI). Elle a été développée par Jeremy Bercoff et son équipe en 2004 (Jérémy Bercoff et al., 2004). Le principe de cette technique repose sur l'utilisation combinée de la force de radiation ultrasonore comme source de cisaillement et d'un échographe ultra-rapide capable d'analyser

les images à très hautes cadences. L'un des avantages majeurs de cette technique est qu'elle utilise une seule sonde pour à la fois créer le cisaillement et imager sa propagation.

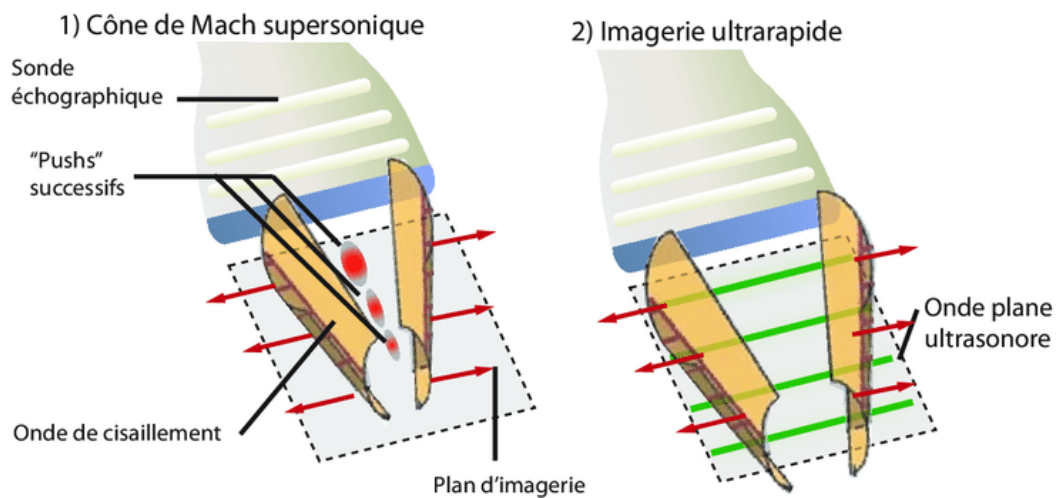


Figure 16 : Schéma illustrant la technique d'élastographie par onde de cisaillement supersonique (Supersonic Shear wave Imaging). 1) Les ultrasons sont focalisés successivement à des profondeurs différentes pour créer des poussées par pression de radiation ("pushs"). Les interférences constructives des ondes de cisaillement forment un cône de Mach supersonique (dans lequel la vitesse de la source est supérieure à celle de l'onde générée) et une onde plane de cisaillement est créée. 2) L'échographe passe ensuite en mode d'imagerie ultrarapide pour suivre l'onde de cisaillement qui se propage dans le milieu (Deffieux, 2008).

De façon plus précise, cette technique repose sur deux caractéristiques (Figure 16) :

**La force de radiation ultrasonore :** Elle est créée par une sonde électronique faite de matériaux piézo-électriques, et résulte de la focalisation d'un faisceau ultrasonore pendant une certaine durée, typiquement de quelques dizaines à quelques centaines de microsecondes de façon successive à différentes profondeurs. Cela permet d'explorer de très grandes zones (Joline E Brandenburg et al., 2014). Ces ultrasons, qui vont à une vitesse supersonique, forment un cône de Mach et créent des ondes de cisaillement. Sachant que les ondes sources se déplacent dans le tissu plus rapidement que les ondes de cisaillement qu'elles créent, ces dernières interfèrent donc de façon constructive entre elles pour créer deux ondes planes dans deux directions différentes en 3D (cône) tout comme le ferait un avion supersonique (Figure 17) (Jeremy Bercoff et al., 2004). Ces ondes planes permettent même de simplifier les hypothèses de propagation au cours de la résolution du problème inverse lors du calcul du module de Young (Deffieux, 2008).

**L'imagerie ultra-rapide :** La vitesse d'acquisition des images est de l'ordre 30000 images par seconde (e Lima et al., 2018) ce qui permet de suivre l'onde de cisaillement qui se propage dans

le milieu (Deffieux, 2008). Une autre application de cette vitesse d'acquisition ultra-rapide est qu'elle permet de faire abstraction de la respiration et des mouvements du patient.

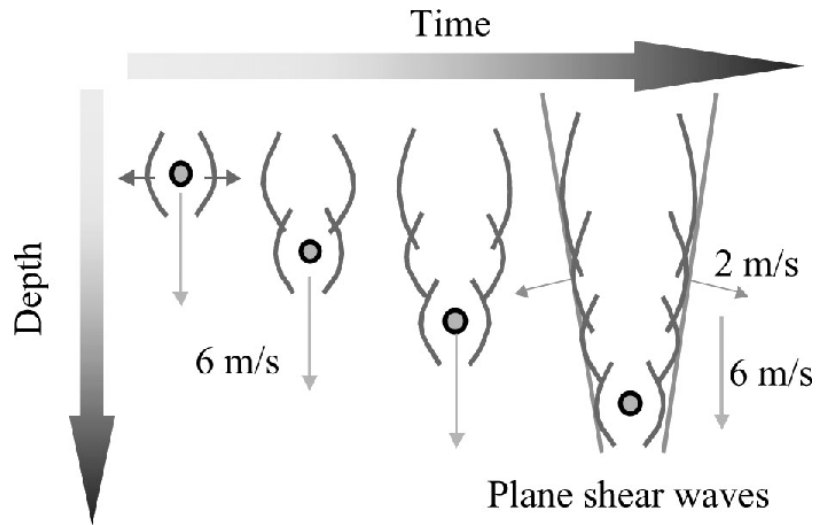


Figure 17 : Génération de l'onde de cisaillement supersonique : la source est déplacée séquentiellement le long de l'axe du faisceau, créant deux ondes de cisaillement planes et intenses (J. Bercoff et al., 2004)

Le traitement des images repose sur une comparaison des images acquises au cours de la propagation de l'onde avec l'image initiale avant l'application de l'onde. Le module de Young est extrait de la vitesse de progression de l'onde plane de cisaillement qui est obtenue à partir du champ de déplacement acquis (De Zordo et al., 2009). Une cartographie de l'élasticité est donc créée et superposée à une image anatomique en mode B (mode en contraste de phase), ce qui permet à l'opérateur d'être mieux guidé (Figure 18).

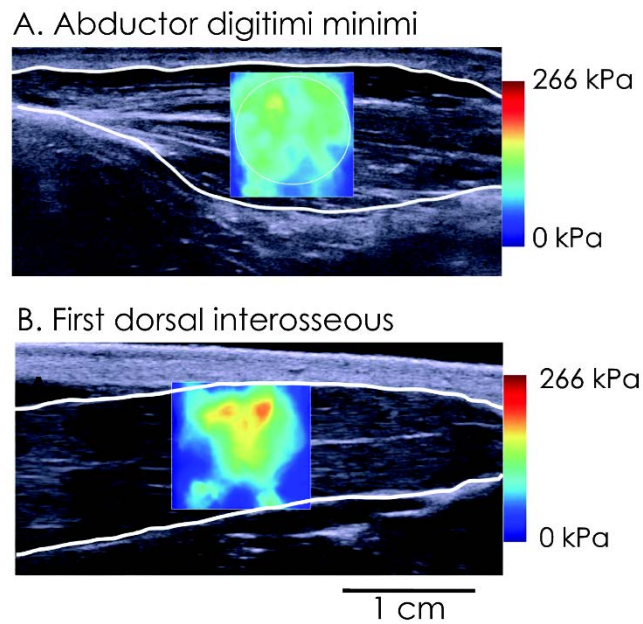


Figure 18 : Exemple type de mesure du module élastique de cisaillement du muscle abducteur de l'auriculaire (A) et du muscle interosseux (dorsal) de la main (B). (Bouillard et al., 2011)

Cette technique présente de nombreux avantages. Nous pouvons citer la reproductibilité des mesures et leurs indépendances vis-à-vis de l'utilisateur, la production de données quantitatives en temps réel, l'absence de nécessité d'avoir un grand nombre d'acquisitions, son coût relativement bas, la qualité du contraste, et la grande profondeur de déformation (e Lima et al., 2018).

#### 2.2.8. *Propriétés mécaniques multi-échelles :*

Comme nous l'avons vu précédemment, les propriétés mécaniques peuvent être mesurées à différentes échelles biologiques. Les organes et les tissus étant formés d'un assemblage de cellules connecté à la matrice extracellulaire, il est envisageable d'émettre l'hypothèse qu'il existe un continuum mécanique de l'échelle de la cellule jusqu'à l'organe. (Figure 19).

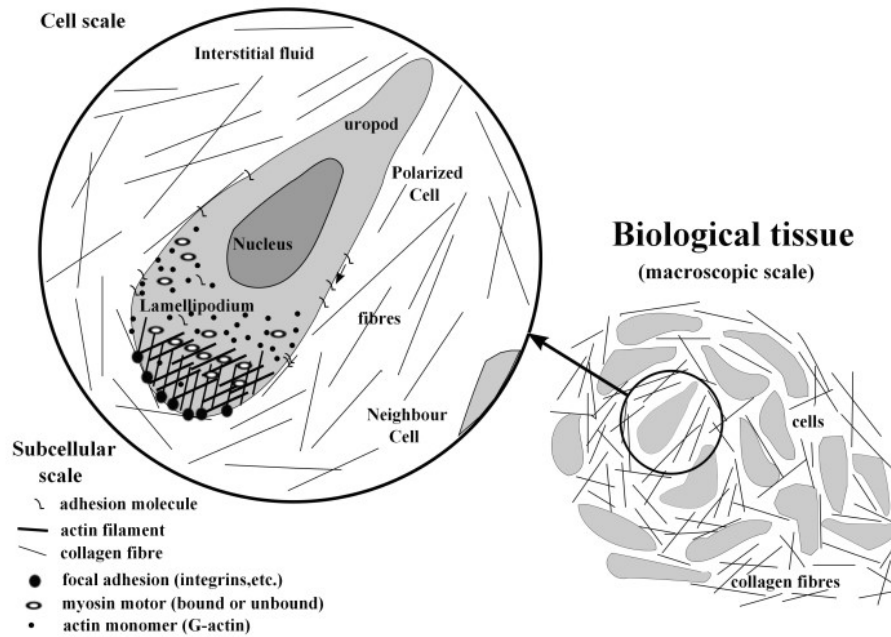


Figure 19 : Vue multi-échelle de la mécanique cellulaire. Un tissu biologique est constitué de plusieurs composants, y compris les cellules et la matrice extracellulaire. Ceux-ci ont leurs propres propriétés mécaniques et leur propre organisation. Un zoom permet d'identifier à l'échelle microscopique divers éléments interagissant pour créer la mécanique cellulaire (filaments d'actine, molécules d'adhésion dans les adhésions focales) (Chauvière et al., 2010).

Pour étayer cette hypothèse, nous pouvons citer deux exemples de matériaux tels que le bambou et l'os dont les structurations internes sont semblables. En effet, elles apparaissent organisées sous la forme d'une structure multi-échelle depuis l'échelle nanoscopique (cellulose dans le cas du bambou) à l'échelle macroscopique (bambou et os) Figure 20. Une étude montre que dans le cas du bambou si la moindre sous-structure vient à être détériorée comme les microfibrilles ou les fibres, d'un point de vue mécanique, le bambou voit ses propriétés mécaniques affectées. Étant donné les similitudes dans la construction de leur structure interne, il semble raisonnable de proposer que l'os et plus généralement les structures biologiques organisées sur plusieurs échelles suivent le même comportement que le bambou dans le cas de la présence d'un défaut mécanique au niveau d'une sous-structure.

Plus spécifiquement, cette détérioration peut provenir de plusieurs facteurs influençant les propriétés mécaniques, et notamment la rigidité des matériaux multi-échelle. De façon non-exhaustive on peut citer : Le type et la qualité des constituants et donc leurs propriétés mécaniques intrinsèques, leur arrangement, leur forme, leur taille, les matrices qu'il y a entre les différentes échelles ou ce qu'on appelle en biologie la matrice extra-cellulaire et la porosité (Wegst et al., 2015).

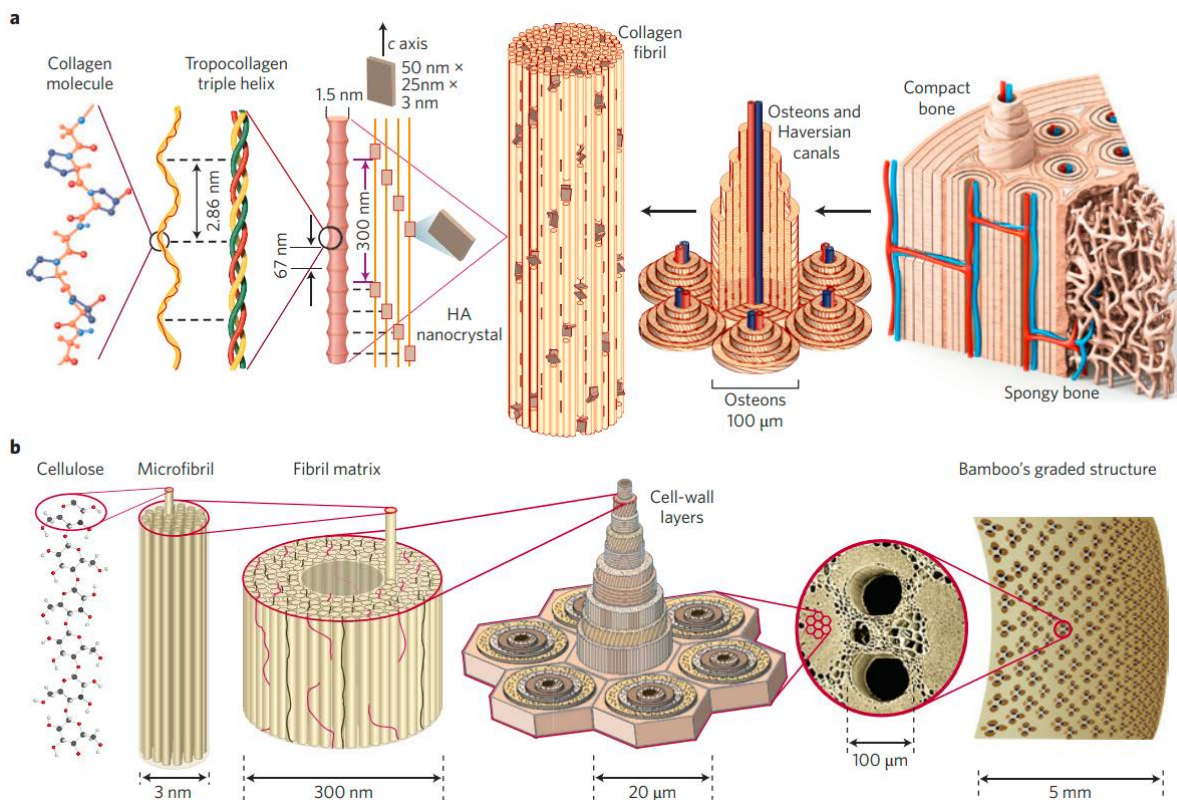


Figure 20 : Structure hiérarchique d'os et de bambou. a. Dans l'os, les arrangements macroscopiques impliquent à la fois l'os compact/cortical à la surface et l'os spongieux/trabéculaire (matériau semblable à de la mousse avec ~100- $\mu\text{m}$ -épaisseurs jambes) à l'intérieur. L'os compact est composé d'ostéons et de canaux haversiens, qui entourent les vaisseaux sanguins. Les ostéons ont une structure lamellaire, avec des lamelles individuelles constituées de fibres disposées en motifs géométriques. Les fibres comprennent plusieurs fibrilles de collagène minéralisées, composées de molécules de protéines de collagène (tropocollagène) formées de trois chaînes d'acides aminés et de nanocristaux d'hydroxyapatite (HA), et liées par une phase organique pour former des réseaux de fibrilles. b. Le bambou est composé de fibres de cellulose imbriquées dans une matrice lignine-hémicellulose en forme de cellules prismatiques creuses d'épaisseur de paroi variable. Dans le bambou et le palmier, qui ont une structure plus complexe que le bois, un gradient de densité radiale de fibres parallèles augmente la rigidité. Le bambou augmente encore sa rigidité flexuelle en combinant un gradient de densité radiale avec une forme transversale en tube creux (Wegst et al., 2015).

Il est à noter que peu d'études ont abordé la caractérisation mécanique d'un système biologique de l'échelle cellulaire jusqu'à l'organe. Nous pouvons en citer une qui s'en rapproche et qui s'est intéressée aux propriétés mécaniques du tissu cérébral. Les auteurs ont d'abord réalisé des essais de fluage et de relaxation par microscope à force atomique à une résolution microscopique et des expériences d'indentation d'impact à une résolution méso. Ces essais ont été effectués sur des tissus cérébraux de souris de 350  $\mu\text{m}$  et 6 mm d'épaisseur respectivement. Ils ont ensuite réalisé des expériences de rhéométrie par plaques parallèles pour quantifier les modules élastiques de cisaillement dépendant de la fréquence à une résolution macroscopique sur des tisses cérébraux de porc de 6 mm d'épaisseur (Canovic et al., 2016). Ils ont donc utilisé



différents outils de résolutions différentes afin de mesurer les propriétés mécaniques à une même échelle biologique (le tissu cérébral).

### 2.3. Relation propriétés mécaniques – état de santé :

Précédemment, nous avons énoncé, d’une part, que des changements ou des altérations de la structure du cytosquelette reflètent des modifications du comportement ou de la fonction de ces matériaux biologiques, induisant dans certains cas des pathologies ou des changements de l’état de santé de l’organisme, et d’autre part que ce même cytosquelette est majoritairement responsable des propriétés mécaniques de la cellule et du tissu. Donc par transitivité nous proposons que les propriétés mécaniques du matériau biologique peuvent être des marqueurs de l’état de santé de celui-ci (Di Carlo, 2012).

Par exemple, comme le présente la Figure 21 des études ont montré que la déformabilité des cellules cancéreuses était plus grande que celle des cellules saines (M. Lekka et al., 2012), ou encore, que la rigidité des globules rouges était augmentée en cas de désorganisation du cytosquelette (Lai et al., 2015).

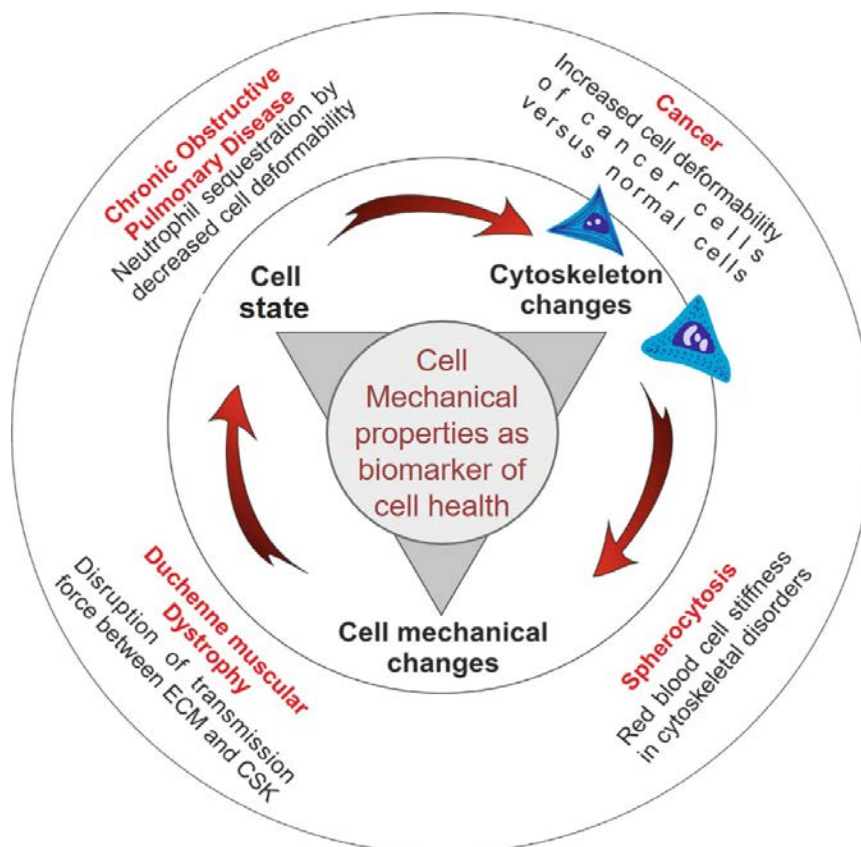


Figure 21 : Schéma montrant que les propriétés mécaniques sont des biomarqueurs de l’état de santé en donnant des exemples sur la relation entre les changements au niveau du cytosquelette, les propriétés mécaniques de la cellule et l’état de santé de la cellule. Adapté de (Di Carlo, 2012).



### 3. Muscle :

#### 3.1. Structure du muscle squelettique

Avec les tissus conjonctifs, épithéliaux et nerveux, le tissu musculaire constitue l'un des 4 tissus du corps humain. Il est composé de cellules spécialisées, allongées et contractiles. Il est de ce fait responsable du mouvement et de la posture du corps humain. Le muscle se divise, suivant son apparence, sa structure et surtout sa fonction, en muscles striés et muscles lisses (Figure 22). Les muscles striés sont nommés ainsi parce qu'ils apparaissent « rayés » en lumière blanche sous microscope.

Ces stries sont dues à la composition de ce type de muscle d'unités structurales périodiques appelées sarcomères.

Dans les muscles striés, nous trouvons (Mescher, 2013; Ross et al., 2016) :

- Les muscles cardiaques tels que les muscles du cœur.
- Les muscles squelettiques tels que le quadriceps ou le biceps.

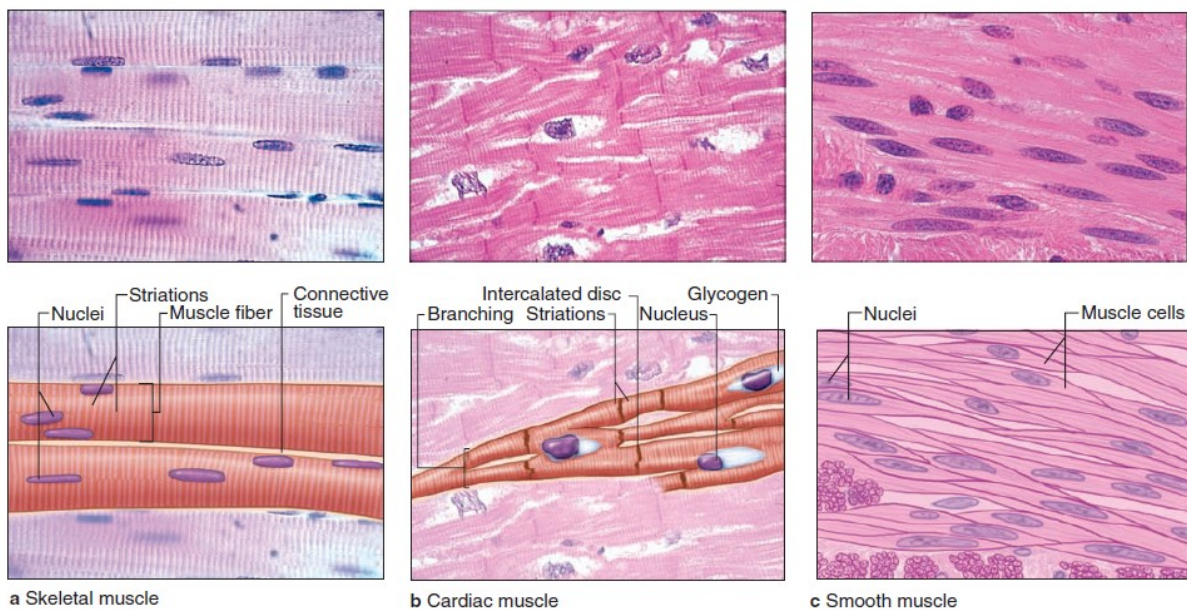


Figure 22 : Photomicrographies des 3 types de muscles accompagnés de dessins étiquetés. (a) Le muscle squelettique est composé de grandes fibres multinucléées allongées qui présentent des contractions fortes, rapides et volontaires. (b) Le muscle cardiaque est composé de cellules ramifiées irrégulières reliées entre elles longitudinalement par des disques intercalés et présente de fortes contractions involontaires. (c) Le muscle lisse est composé de cellules fusiformes groupées avec de faibles contractions involontaires. La densité de remplissage intercellulaire observée reflète la faible quantité de tissu conjonctif extracellulaire présente. (a, b): x200. (c): x300. H&E. (Mescher, 2013)

Les muscles cardiaques se composent de cellules qui se contractent involontairement, ils ne fatiguent pas et ont un faible besoin énergétique, tandis que les muscles squelettiques sont constitués de cellules à contraction volontaire, qui fatiguent rapidement et qui ont un fort besoin énergétique (Mukund et al., 2020). Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur ces derniers.

### 3.1.1. *Muscle squelettique :*

Avec plus de 600 muscles individuels (Chal et al., 2017) et environ 40% de la masse corporelle (Frontera et al., 2015), les muscles squelettiques constituent le tissu le plus présent dans le corps humain. De ce fait, ils contribuent de façon significative à plusieurs fonctions. D'un point de vue mécanique, ils convertissent l'énergie chimique en énergie mécanique pour générer de la force, maintenir la posture et produire du mouvement. Ils assurent donc une autonomie fonctionnelle. D'un point de vue métabolique, ils contribuent au stockage des acides aminés et des carbohydrates nécessaires aux autres tissus et assurent le maintien de la température corporelle (85% de la chaleur corporelle est issue de l'activité musculaire) (Frontera & Ochala, 2015; Wolfe, 2006).

Toutes ces fonctions sont assurées grâce à une architecture hautement organisée du muscle squelettique.

Comme illustré sur la Figure 23, le muscle squelettique est une structure multi-échelle. Il est composé de cellules musculaires (plus communément appelées fibres musculaires ou myofibrilles) et de matrice extracellulaire constituée de tissu conjonctif fibreux. Il est généralement attaché aux os grâce à des tendons qui représentent la continuité de ces tissus conjonctifs et qui aident à la transmission de la force.

Plus en détail, le muscle est enveloppé d'un tissu conjonctif dense appelé épimysium. Celui-ci englobe des « faisceaux » composés d'un certain nombre de fibres musculaires entourées d'une autre couche de tissu conjonctif appelée péri-mysium. Ces fibres musculaires sont, quant à elles, individuellement séparées par l'endomysium et sont entourées de leur membrane plasmique, appelée sarcolemme, et de la membrane basale. Chaque fibre musculaire mature est composée de centaines de myofibrilles et chaque myofibrille est assemblée en une suite de sous-unités contractiles appelées sarcomères. Cette contraction est activée par l'acétylcholine qui émane des motoneurons qui innervent les fibres musculaires et qui activent la libération de  $Ca^{2+}$  par le réticulum sarcoplasmique (équivalent du réticulum endoplasmique lisse). Il est à noter aussi que ces fibres musculaires sont des cellules multinucléées qui se régénèrent grâce à des cellules

souches adultes, appelées cellules satellites (SCs). Ces dernières se trouvent dans des « niches » entre le sarcolemme et la membrane basale et donc à la périphérie de la fibre (d'où leur nom, satellites) (Exeter et al., 2010; Frontera & Ochala, 2015; Holmberg et al., 2013; Mukund & Subramaniam, 2020; Tajbakhsh, 2009)

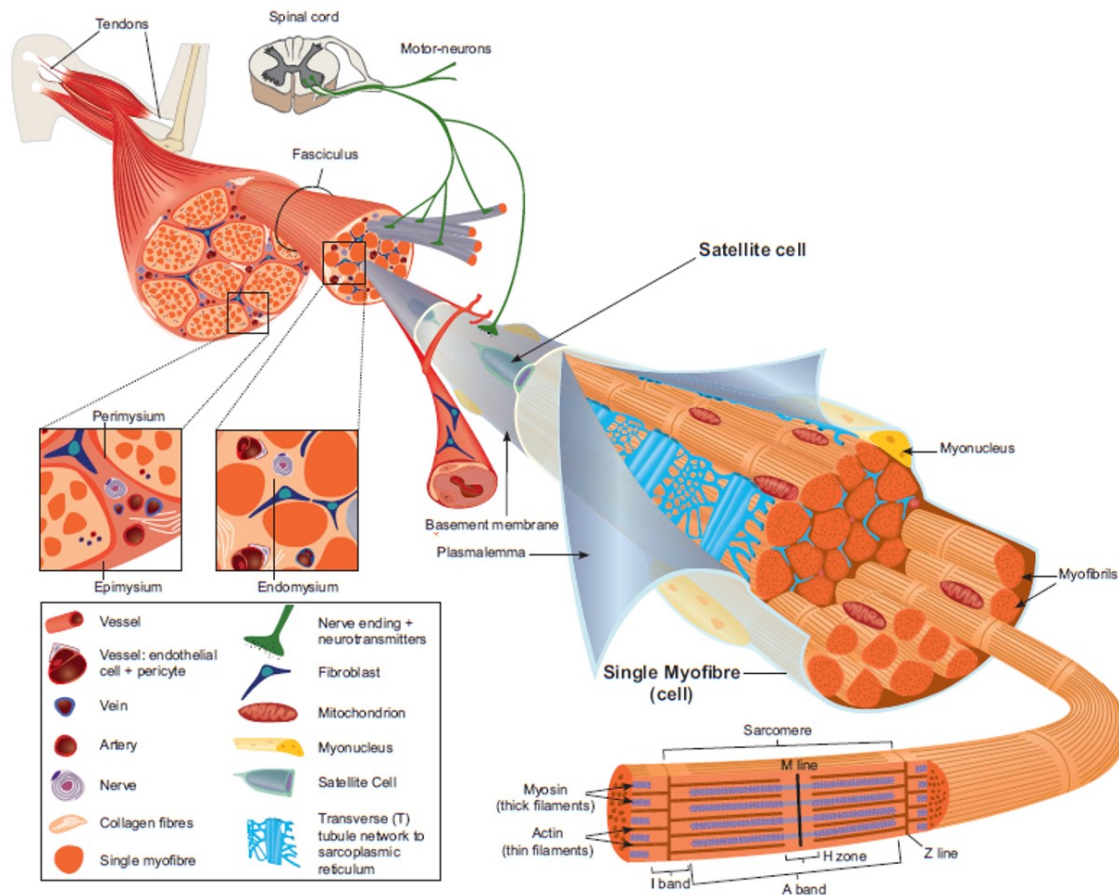


Figure 23 : Schéma multi-échelle et hiérarchique du muscle squelettique et des structures associées adapté de Tajbakhsh et al (Tajbakhsh, 2009)

Parmi les différents critères qui ont été utilisés pour classifier les fibres musculaires, la classification la plus fréquente repose sur la vitesse de contraction (rapide vs lente), la prédominance d'une voie métabolique ou enzymatique (oxydative vs glycolytique) et le degré de fatigabilité (fatigue vs résistance à la fatigue). On distingue de ce fait 3 types de fibres (MacIntosh et al., 2006) :

- Type I : Lent, oxydatif et résistant à la fatigue.
- Type IIA : Rapide, oxydatif et résistant à la fatigue.
- Type IIB : Le plus rapide, glycolytique et fatigable.

Ainsi, les muscles composés d'une majorité de fibres musculaires à contraction rapide, comme le quadriceps, le tibialis anterior ou encore l'EDL, sont appelés muscles à contraction rapide tandis que ceux composés majoritairement de fibres musculaires à contraction lente, comme le soleus, sont appelés muscles à contraction lente.

### 3.1.2. *Fibres musculaires :*

#### a. Définition

Les fibres musculaires squelettiques, plus communément appelées cellules musculaires, sont des grandes cellules filiformes dont le diamètre et la longueur varient respectivement de 10  $\mu\text{m}$  à 100  $\mu\text{m}$ , et de 1 mm à 30 cm (ex : le muscle sartorius). Ce sont des cellules multinucléées puisqu'elles résultent de la fusion de plusieurs cellules mononucléées appelées myoblastes (voir Myoblastes : plus loin). Les noyaux de ces fibres sont localisés à la périphérie du sarcoplasme (Figure 14) (nom donné au cytoplasme dans le cas du tissu musculaire) juste au-dessous du sarcolemme (Ross & Pawlina, 2016). Ils sont très nombreux, distribués sur la longueur de la fibre et sont parfois concentrés, comme autour des jonctions neuromusculaires. Rappelons que ces dernières permettent d'activer la contraction de ces fibres (Feher, 2012). A titre d'exemple, on peut trouver jusqu'à 3000 noyaux dans une fibre de biceps humain (Snijders et al., 2020). La présence d'un très grand nombre de noyaux est indispensable à la cellule pour qu'elle produise les protéines en quantité suffisante. En effet, le sarcoplasme de la fibre musculaire se compose non seulement de myofibrilles (série de sarcomères) mais aussi d'autres protéines du cytosquelette et des organelles telles que les mitochondries, le réticulum sarcoplasmique ou l'appareil de Golgi (Trovato et al., 2016).

#### b. Cytosquelette et protéines associées de la fibre musculaire :

La structuration du cytosquelette de la cellule musculaire est très particulière comparée à celle des cellules constitutives des tissus épithéliaux et endothéliaux. Ceci tient au fait qu'une des fonctions principales de la cellule musculaire est la contraction. D'ailleurs, le terme « cytosquelette », qui est normalement utilisé pour décrire l'ensemble du réseau de protéines et filaments que contient le sarcoplasme (Gautel et al., 2016), se subdivise dans la cellule musculaire en plusieurs systèmes (Figure 24) (Berthier et al., 1997):



- Cytosquelette sarcomérique : Le sarcomère, plus largement décrit plus bas, est composé de deux sous-structures du cytosquelette. Le premier, appelé le cytosquelette sarcomérique contractile, est constitué d'une alternance de filaments parallèles qui sont les myofilaments fins d'actine et les filaments épais de myosine. Le deuxième est le cytosquelette intra-sarcomérique. Il contient des protéines, telles que la titine, la nébuline et la tropomyosine, qui ancrent et régulent la dynamique de contraction des myofilaments.
- Cytosquelette péri-sarcomérique et inter-fibrillaire : Il est composé principalement de microtubules, qui servent à organiser l'emplacement des noyaux, de filaments intermédiaires tels que la desmine qui lie les myofibrilles adjacentes entre elles et de filaments d'actine qui servent d'ancrage aux costamères (complexes protéiques liant le cytosquelette à la matrice extracellulaire).
- Cytosquelette sub-sarcolémal : Il est responsable du lien entre le sarcolemme et les myofibrilles adjacentes et assure une liaison avec la matrice extracellulaire. Il est principalement composé de costamères.

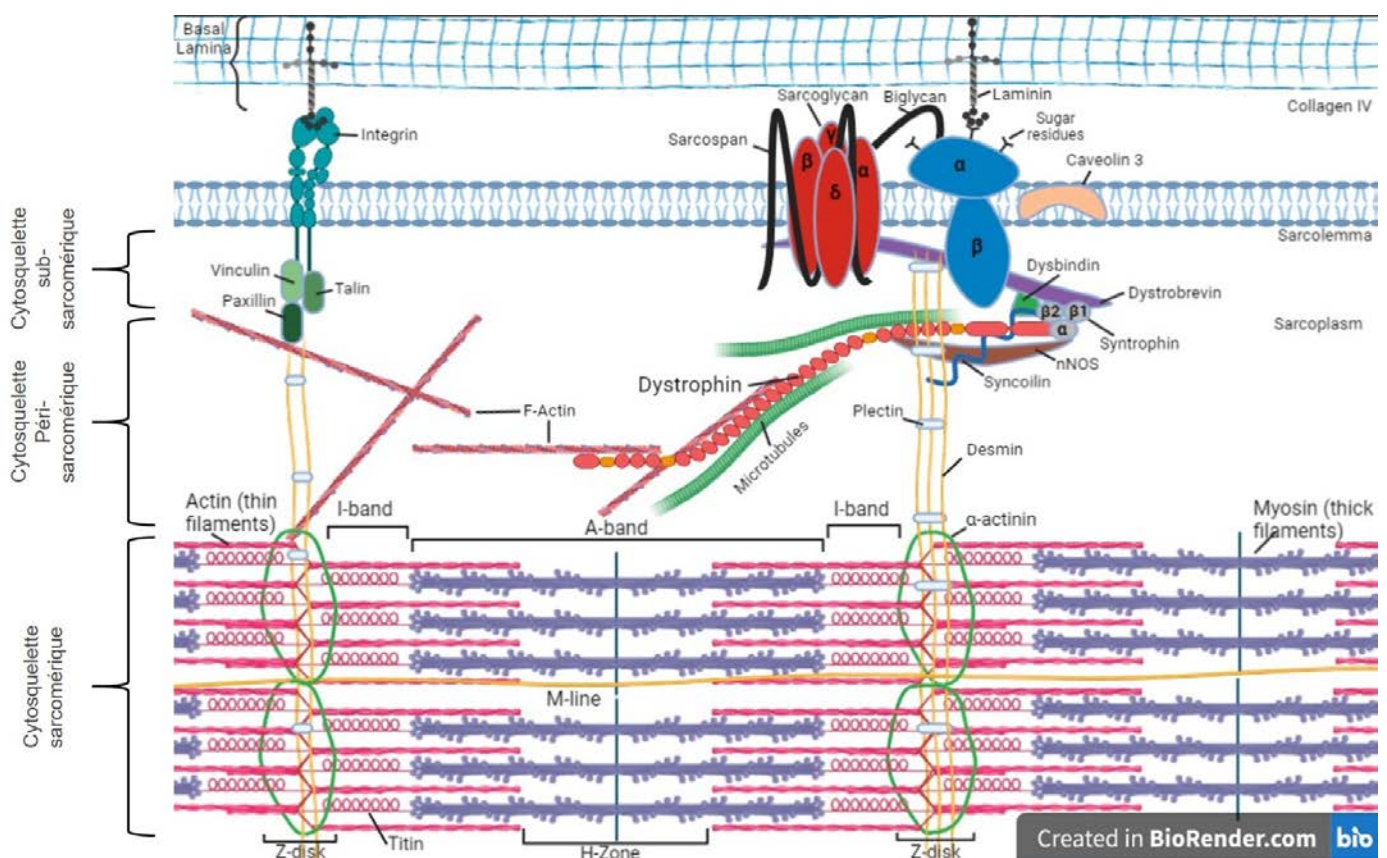


Figure 24 : Schéma du cytosquelette d'une fibre musculaire.

- Sarcomère (Figure 25 et Figure 26) :

Le sarcomère est l'unité contractile de la myofibrille et donc de la fibre musculaire. C'est la structure responsable de la contraction musculaire. Il est limité de part et d'autre par des disques de protéines appelés disques Z (ligne Z, Figure 26) et est principalement composé de filaments épais et fins. Plus précisément, les filaments épais sont composés de centaines de molécules de myosine de type 2. Cette molécule est formée de 2 brins de protéines en torsion coiffées à leurs extrémités d'une tête globulaire qui joue le rôle de moteur de contraction. Deux filaments de myosine sont liés au niveau de la ligne M qui se trouve au centre du sarcomère (Exeter & Connell, 2010). Ces filaments épais de myosine sont connectés à des protéines liant la myosine (myosin binding proteins) qui à leur tour interagissent avec la titine. La titine est une protéine élastique géante (la plus grande protéine connue (Sela, 2002)) qui s'étend tout le long des filaments épais. Elle participe à l'échafaudage moléculaire nécessaire à la formation des filaments épais et sert de lien élastique entre ces derniers et le disque Z (Gautel & Djinić-Carugo, 2016; K. Wang et al., 1991). Elle fixe donc la longueur des sarcomères lors de la contraction et est souvent assimilée à un ressort (Nishikawa, 2020).

Le sarcomère est également composé de filaments fins. Ceux-ci sont à leur tour composés de filaments d'actine en double hélice et de ses protéines associées telles que la nébuline et le couple troponine/tropomyosine. Ce dernier joue un grand rôle dans la contraction musculaire. En effet, la tropomyosine recouvre le domaine de liaison entre l'actine et la myosine. En présence d'un excès de  $Ca^{2+}$ , la troponine déplace la tropomyosine de son emplacement sur le filament fin et permet l'interaction des têtes de myosine avec l'actine. Ainsi, les filaments fins glissent sur les filaments épais (Costa, 2014). Notons que ces filaments fins sont liés d'un côté aux disques Z par l' $\alpha$ -actinine, et d'un autre côté à (leur extrémité libre) à la tropomoduline. Cette protéine, qui fait office de capuchon, bloque la (dé)polymérisation de l'actine (Gokhin et al., 2015; Mukund & Subramaniam, 2020). Ainsi, le glissement des filaments fins sur les filaments épais induit le déplacement des disques Z et par conséquent conduit à la contraction du sarcomère puis de la fibre tout entière.

L'assemblage de toutes ces protéines donne lieu à une différence de contraste lors de l'observation d'une fibre musculaire au microscope optique et électronique (Figure 26). En effet, nous distinguons :

- Bande A, pour bande anisotrope : C'est une bande sombre, dense, qui ne laisse pas passer la lumière polarisée et qui se trouve au niveau des filaments épais. Elle reflète cependant la superposition des filaments fins et épais.
- Bande I pour bande isotrope : C'est une bande claire qui laisse passer la lumière polarisée. Cette bande est divisée en deux par le disque Z et représente la superposition de filaments fins et de titine.
- Disque Z : Aussi appelé ligne Z, il vient de l'allemand « zwischen » qui signifie « entre ». C'est une ligne sombre et dense qui limite les sarcomères. Elle est constituée principalement d' $\alpha$ -actinin et sert d'ancrage aux filaments fins et à la titine.
- Disque H : Il vient de l'allemand « Heller » qui veut dire « plus claire ». Il se trouve au milieu de la bande A. C'est la zone de la bande A où les filaments fins sont absents et ne se superposent plus aux filaments épais.
- Ligne M : Elle se trouve au milieu de la bande H et donc exactement au milieu du sarcomère. Elle assure l'ancrage de la titine et des filaments de myosine adjacents.

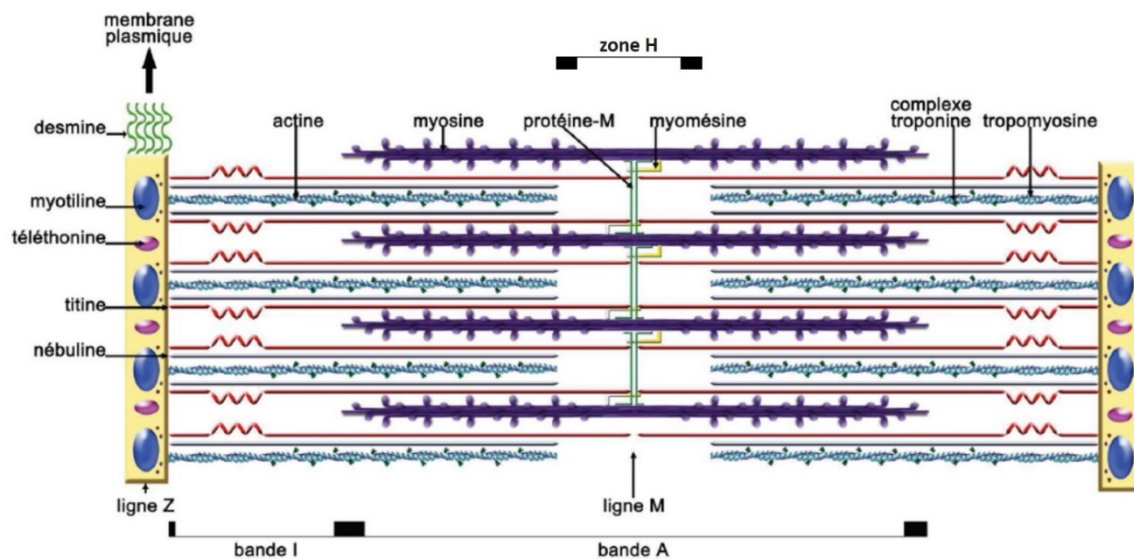


Figure 25 : **Structure du sarcomère.** Représentation schématique de l'organisation des protéines principales du sarcomère. Les filaments d'actine sont ancrés à la ligne Z. L'extrémité N-terminale de la titine est dans la ligne Z et la protéine s'étend jusqu'à la ligne M. Adapté de (Pottecher, 2012).

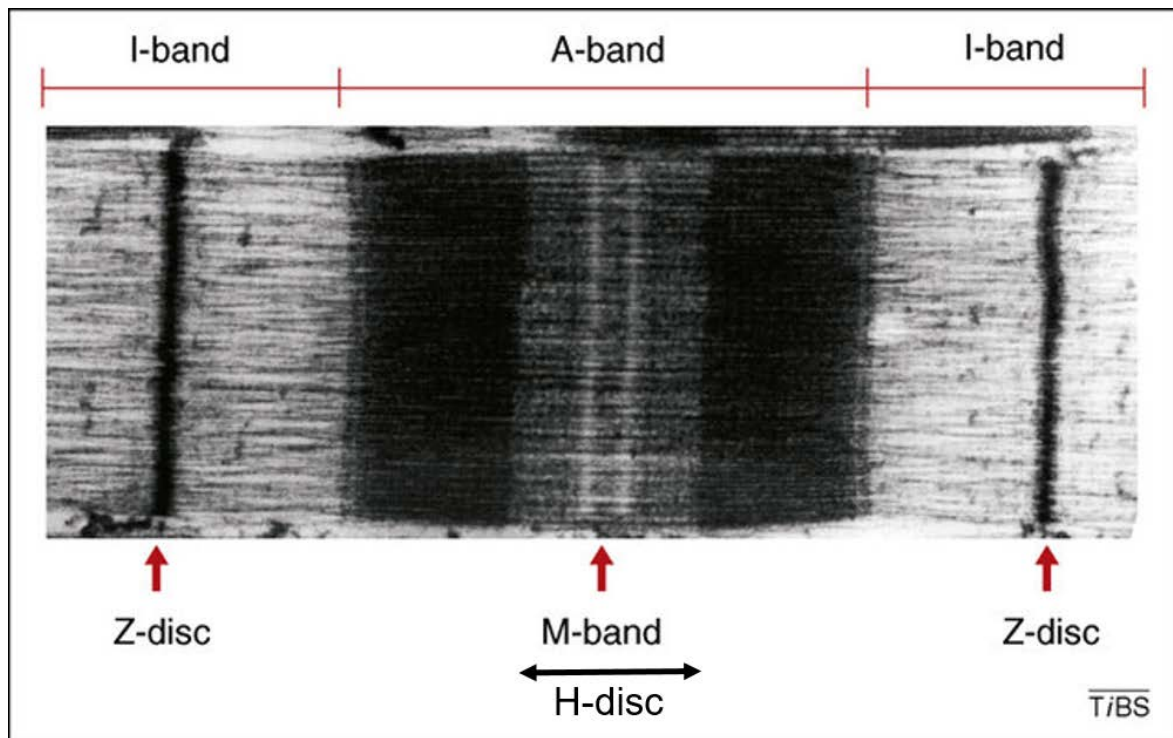


Figure 26 : Image prise en microscopie électronique d'un sarcomère de muscle strié. La plupart des taches sombres montrent la présence des principaux systèmes de filaments actine, de myosine et de la titine. Les fibres de titine s'étendent du disque Z périphérique à la bande M centrale. Les filaments de liaison myomesine et filamine C ne sont pas visibles sur cette image. Cependant, des études de biochimie couplées à des images prises en microscopie immuno-électronique et biochimique, ont montré que ces derniers sont localisés au niveau de la bande M centrale et du disque - Z. Les différents segments de sarcomères sont indiqués. Adapté de (Pinotsis et al., 2023).

- Filaments d'actine  $\gamma$  :

Dans le génome humain, il existe 6 gènes d'isoformes d'actine. Dans le muscle squelettique, on retrouve l'isoforme  $\alpha$ -squelettique présent dans les filaments fins et l'isoforme  $\gamma$  cytoplasmique principalement localisé au niveau des costamères (Gunning et al., 2015; Rybakova et al., 2000). Les filaments d'actine  $\gamma$  servent de lien mécanique entre les disques Z et les costamères.

- Microtubules :

Dans la fibre musculaire, les microtubules s'organisent en forme de grille (Oddoux et al., 2013). En effet, ils sont soit longitudinaux et parallèles soit orthogonaux aux myofibrilles (interfibrillaires). Ils sont concentrés autour des noyaux et sont liés aux membranes de Golgi. Cet assemblage moléculaire sert de point de nucléation ou centre d'organisation des microtubules non-centrosomaux (ncMTOC) (Akhmanova et al., 2022). Ces points de nucléation diffèrent des MTOC classiquement retrouvés dans d'autres types cellulaires. Ceci tient au fait que le positionnement des nombreux noyaux retrouvés au sein de la fibre



musculaire, essentiellement assuré par les microtubules, est plus complexe et nécessite une nucléation au niveau de l'enveloppe nucléaire. Le transport de ces noyaux se fait non seulement à l'aide des protéines associées aux microtubules qui les transportent mais aussi grâce aux forces de compression et de traction exercées par les microtubules. En plus de leur rôle dans le positionnement des noyaux, les microtubules servent de protection contre d'éventuels endommagement de l'ADN lors de la contraction. Ils sont également considérés comme des mécano-transducteurs en transférant les signaux mécaniques de la matrice extracellulaire vers les noyaux et des organisateurs du milieu intracellulaire grâce à leurs liens à différentes protéines.

- Costamères et filaments intermédiaires :

La contraction d'une fibre musculaire nécessite la contraction commune et harmonisée de l'ensemble de ses myofibrilles et donc de tous ses sarcomères. Ceci est assuré par l'existence d'un pont moléculaire, appelé costamère, qui ancre le sarcomère au sarcolemme (Peter et al., 2011). Le mot costamère vient du latin « costa » qui veut dire « cote » et du grec « meros » qui veut dire « partie » (Berthier & Blaineau, 1997). Ils sont localisés au niveau des disques Z où ils se lient à l'actine  $\gamma$  qui, à son tour, se lie aux filaments intermédiaires de type desmine. Ces derniers se connectent aux filaments fins des sarcomères, aux disques Z et aux lignes M des myofibrilles adjacentes (Clark, 2002; Feher, 2012). La desmine est localisée un peu partout autour du noyau, des mitochondries mais surtout autour des régions d'adhérence et des disques Z afin de maintenir les myofibrilles entre elles. Elle participe de ce fait à l'intégrité structurelle et cellulaire des muscles, à la synchronisation de la contraction, à la transmission de force et à l'homéostasie mitochondriale (Agnetti et al., 2022). Les costamères se lient aussi également à la filamine-C, protéine constitutive des disques Z (Henderson et al., 2017).

Il existe 2 principaux complexes costamériques (Feher, 2012) :

- Le complexe d'adhérence focale : Il se compose de l'intégrine qui se lie d'un coté à la desmine grâce à la vinculine et la taline et de l'autre à la laminine, protéine de la matrice extracellulaire.
- Le complexe dystrophine-glycoprotéine (DGC) aussi appelé complexe dystroglycan. La protéine principale de ce complexe est la dystrophine qui sera décrite plus en détails au paragraphe sur l'Impact de l'absence de la dystrophine sur la structure du muscle squelettique : Brièvement, celle-ci se lie à l'actine  $\gamma$  d'un côté et à la syntrophine et le  $\beta$ -dystroglycan de l'autre. Le complexe contient aussi d'autres protéines telles que la dystrobrevine et l' $\alpha$ -dystroglycan qui lie la syntrophine à la laminine.

Du fait de cette structure, les costamères servent à distribuer les forces du sarcomère à la matrice extracellulaire, à transmettre les signaux mécaniques de l'extérieur de la cellule à son intérieur (mécanotransduction) et à maintenir l'intégrité du sarcolemme (Clark, 2002; Peter et al., 2011)

### 3.1.3. *Myogenèse, régénération musculaire et cytosquelette :*

Le mot myogenèse se compose du latin « myo » qui veut dire « muscle » et « genesis » qui veut dire « naissance ». La myogénèse est l'ensemble des étapes de la formation des tissus musculaires. Elle est contrôlée par des mécanismes de régulation qui peuvent être intrinsèques ou extrinsèques aux cellules musculaires (C. F. Bentzinger et al., 2012). Il existe deux types de myogenèse, la première prénatale qui intervient au cours du développement embryonnaire, et la seconde postnatale, aussi dite régénérative, qui survient à la suite de l'endommagement des tissus musculaires ou à un effort musculaire. Bien qu'elles soient régies par des voies génétiques et des facteurs de transcription qui sont pour la plupart communs, elles divergent dans leurs mises en œuvre. En effet, la myogénèse au cours du développement est due à une programmation intrinsèque des cellules musculaires tandis que la myogénèse régénérative est activée par des signaux extrinsèques en provenance des cellules satellites et de leur microenvironnement (niche) suite à lésion musculaire ou des myopathies (C. Bentzinger et al., 2010; C. F. Bentzinger et al., 2012; Lander et al., 2012; Tajbakhsh, 2009) . Dans notre étude, nous nous focaliserons uniquement sur la myogénèse régénérative (Figure 27). Nous noterons que la régénération musculaire est maintenue même si les fibres musculaires en elles-mêmes sont incapables de se diviser. Ce phénomène fait appel à des cellules progénitrices indifférenciées et quiescentes nommées cellules satellites (C. F. Bentzinger et al., 2012).

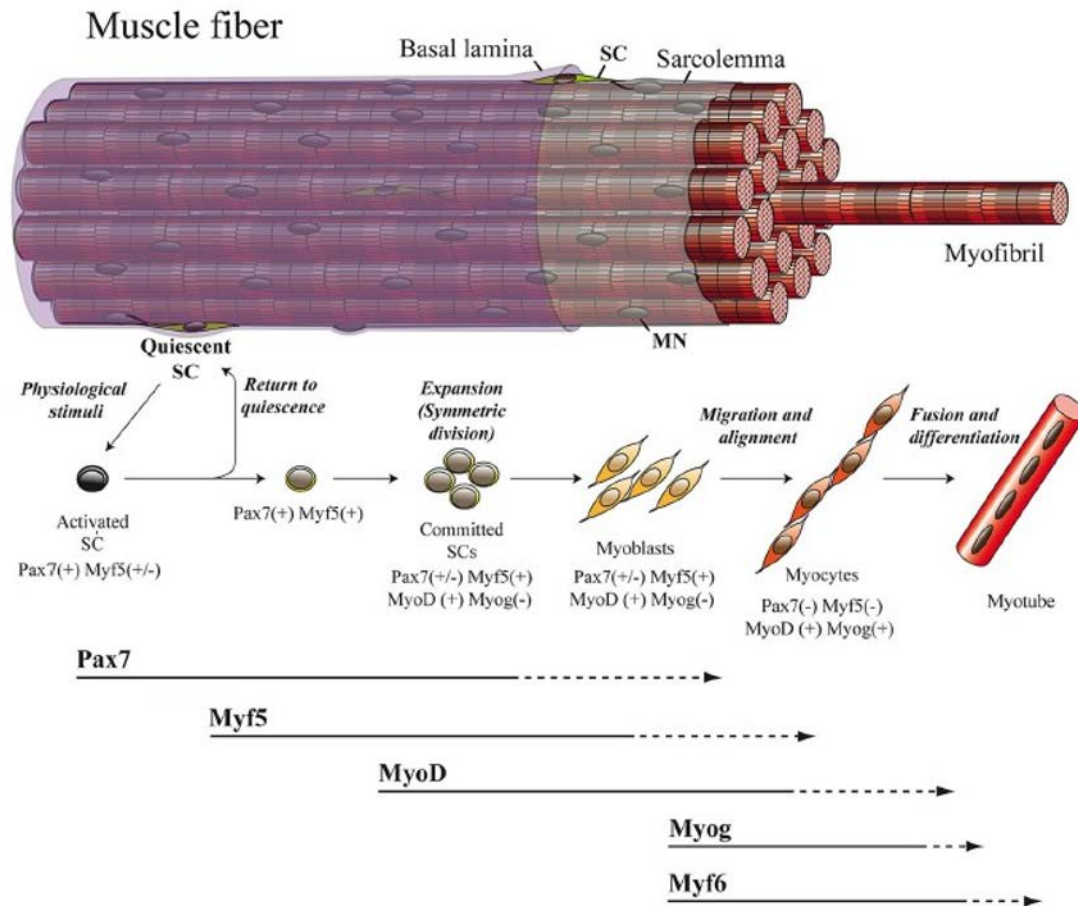


Figure 27 : Vue globale de la voie de différenciation myogénique qui comprend l'activation des SCs quiescentes, l'amorce de la différenciation, la prolifération, la fusion pour former des myotubes et finalement la maturation en myofibrilles. SC, cellule satellite ; MN, myonoyau. (Hernandez-Torres et al., 2017).

### 3.1.4. Cellules satellites :

Les cellules satellites ont été découvertes pour la première fois en 1961 (Katz, 1961; Mauro et al., 1961) en tant que cellules potentiellement précurseurs des myoblastes. Depuis, beaucoup de travaux ont montré que les SCs constituent une population de petites cellules souches musculaires adultes (d'environ 20 µm de long (Costa, 2014)) localisées à la périphérie de la fibre musculaire (d'où leur nom de cellules satellites), entre la lame basale et le sarcolemme et dans un microenvironnement qu'on appelle « la niche » (Yin et al., 2013). Ces cellules ont pour rôle d'assurer la régénération, la croissance et la stabilité des muscles (Zanou et al., 2013). Au stade postnatal précoce, elles sont présentes dans le muscle à hauteur de 30% à 35% tandis qu'à l'âge adulte, elles ne représentent que 2% à 7% des cellules du muscle (Yin et al., 2013). Le processus de régénération musculaire s'enclenche lorsque les SCs sont stimulées par des signaux mécaniques et biologiques extracellulaires depuis la fibre musculaire endommagée. Ces signaux, dont les facteurs dérivés de la myofibrille endommagée (DMDFs) tels que la créatine

kynase (CK) ou le glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Tsuchiya et al., 2020), sont notamment transmis par l'intégrine  $\alpha7\beta1$  présente au niveau de la membrane de la fibre musculaire et liée à la lame basale (Blanco-Bose et al., 2001). Ils sont alors transformés en signaux chimiques dans la cellule (Boppart et al., 2006). Au départ, les SCs expriment, en fonction du muscle soit le facteur de transcription Pax7 soit Pax3. Dans les muscles du tronc et du diaphragme ainsi que certains muscles des membres expriment principalement Pax3, mais les muscles de la tête, qui sont d'origine différente, ne l'expriment pas (Frédéric Relaix et al., 2006). Initialement, il était admis que lorsqu'elles étaient activées, 90% d'entre elles exprimaient la protéine Myf5 en plus du Pax7, ce qui signifie qu'elles étaient engagées dans la voie myogénique. Ces cellules sont alors appelées cellules satellites progénitrices. Les 10% restants n'expriment pas Myf5. Elles retournent à leur état de quiescence et sont appelées cellules satellites souches (Figure 27) (Hernandez-Torres et al., 2017). Cependant, les progrès techniques récents ont révélé un niveau plus élevé de complexité dans les signatures moléculaires de la quiescence et de l'activation (F. Relaix et al., 2021). Ces progrès ont bousculé le dogme des cellules satellites qui existaient soit en état de quiescence ou d'activation. En effet, un nouveau statut intermédiaire a été découvert en 2014 décrivant un état d'alerte  $G_{alerte}$  qui serait entre l'état  $G_0$  de quiescence et l'état  $G_1$  d'activation (Rodgers et al., 2014).

Lors de l'activation, les cellules satellites expriment Pax7, Myf5 et MyoD. Elles deviennent ce qu'on appelle des myoblastes. Au début de l'activation, les SCs sont proches du sarcolemme (Kuang et al., 2007) et migrent en direction du site d'endommagement. Au cours de la migration, elles peuvent traverser la lame basale voire le tissu conjonctif si le site d'endommagement n'est pas sur la même fibre musculaire (Schultz et al., 1985; Watt et al., 1994). En même temps, elles commencent à proliférer et à exprimer Ki67. Nous noterons que lors de la phase proliférative, les SCs peuvent effectuer soit une division symétrique ou une division asymétrique (Cossu et al., 2007). Après la phase de prolifération, Pax7 est moins exprimé par les SCs tandis que les niveaux de MyoD et de Myf5 sont maintenus constants (Zammit et al., 2006).

Concrètement, lorsque les SCs s'activent, elles sortent de leur quiescence, se différencient en myoblastes, et de manière concomitante, elles sortent de leur niche (ou celle-ci est endommagée et perdue), migrent, prolifèrent, et se différencient en myocytes. A côté de ces étapes, plusieurs changements métaboliques sont observés dans les SCs entre un métabolisme quiescent, un métabolisme de prolifération et un métabolisme de différenciation, avec un shift progressif d'un métabolisme glycolitique vers un métabolisme de phosphorylation oxydative (OXPHOS) au

cours de la différenciation (F. Relaix et al., 2021). Les myocytes ensuite s'allongent, s'alignent, s'approchent et se reconnaissent, adhèrent, créent des pores de fusion pour permettre l'échange de matériel cytoplasmique et fusionnent en myotubes qui mûrissent à leur tour en fibres musculaires (Brukman et al., 2019; B. C. Collins et al., 2023; J. H. Kim et al., 2015). Ce long processus se fait grâce à l'activité de plusieurs molécules et protéines extracellulaires, transmembranaires et intracellulaires dont certaines sont explicités ci-dessous. (Pavlath, 2010).

### 3.1.5. *Myoblastes* :

Au début de l'activation, les SCs expriment Pax7, Myf5 et MyoD et sont donc des myoblastes. Par la suite, ces myoblastes perdent l'expression de Pax7 (Olguin et al., 2007) puis l'expression de Myf5 et MyoD vont également être régulées à la baisse (Mukund & Subramaniam, 2020). Ensuite, au début de la différenciation, ces myoblastes commencent à exprimer la Myogénine (MyoG), facteur de transcription essentiel à la différenciation des myoblastes découvert en 1989 (Wright et al., 1989). Ces myoblastes vont migrer et s'aligner les uns aux autres pour former des myocytes (Figure 28). L'expression de MyoG, accompagnée d'un début d'expression de Myf6 (aussi appelée MRF4) est nécessaire au processus d'alignement et de migration des myoblastes. Les myocytes, cellules mononuclées précurseurs des fibres musculaires, fusionnent par centaines voire par milliers (J. H. Kim et al., 2015) entre elles pour former des myotubes ou fusionnent directement avec des myotubes (C. A. Collins et al., 2005; Hindi et al., 2013). Ce phénomène de fusion a été décrit pour la première fois en 1961 (Cooper et al., 1961; Stockdale et al., 1961). Le passage du myoblaste au myotube nécessite que leur cytosquelette soit bien organisé et dynamique au cours de ces différentes étapes (Figure 28). C'est ce que nous allons aborder plus précisément dans la suite de ce paragraphe.

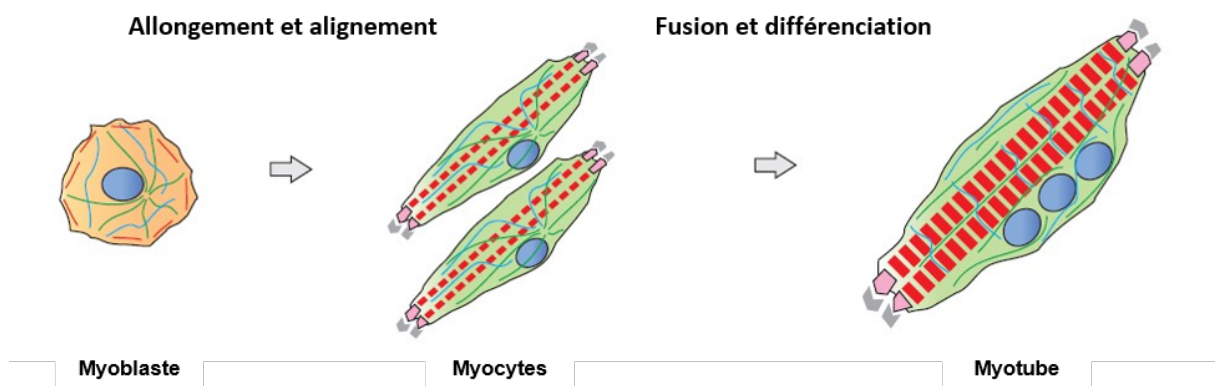


Figure 28 : Schéma global des étapes de la myogénèse squelettique d'un point de vue du cytosquelette. Le cytosquelette du myoblaste (cellule ronde mononuclée) dispose de filaments courts d'actine (rouge) dans le cortex, de filaments intermédiaires (bleu) dispersés et des microtubules (vert) radiaux. Après la réplique, les myoblastes s'alignent les uns avec les autres, et

*leurs filaments d'actine commencent à former les myofibrilles, ancrées dans les régions d'adhésion qui se connectent à la matrice extracellulaire. Après la fusion, les myotubes différenciés sont multinucléés et ont de fortes myofibrilles (suite de rectangles rouges). Les filaments intermédiaires sont présents autour des lignes Z et les microtubules n'ont pas de centre d'organisation unique. Adapté de (Costa, 2014).*

Comme pour d'autres types cellulaires, la migration est associée à des structures complexes et riches en actine tels les filopodes, les lamellipodes, les podosomes ainsi que les fibres de stress responsables des propriétés contractiles liées aux moteurs actomyosines. Ces fibres de stress sont liées aux sites d'adhérence par des adhésions focales et jouent de ce fait un rôle dans la mécanotransduction (Pellegrin et al., 2007) (Figure 29.b et c).

Durant la prolifération, les myoblastes suivent un cycle cellulaire standard dans lequel les microtubules, issus des centrosomes périnucléaires et nécessaires à la division cellulaire, sont orientés de façon radiale (Musa et al., 2003). Afin de réparer les fibres musculaires, les myoblastes prolifèrent beaucoup. D'ailleurs, une inhibition de cette prolifération rend impossible la formation de ces fibres (Pietsch, 1961). Après la prolifération, les cellules s'allongent à l'aide des extensions cellulaires utilisées lors de la migration afin d'adopter une forme bipolaire (myocytes) (Costa, 2014). De ce fait, les microtubules ainsi que les filaments d'actine commencent à s'aligner de façon parallèle avec des ancrages aux extrémités de ces cellules. Ces dernières se détectent grâce à leurs extensions et se reconnaissent principalement à l'aide des protéines transmembranaires de chacune d'entre elles. Parmi ces protéines, on trouve principalement la N- et la M-Cadhérine, la caveoline-3 (Willkomm, 2015) ainsi que la myosine VI qui joue un rôle important dans le contact cellule-cellule à travers la cadhérine (Karolczak et al., 2015). Au sein des myoblastes, il existe différents types de myosine dont chacune joue un rôle précis. A titre d'exemple, nous pouvons citer la myosine à chaîne légère 1 (My11) qui affecte négativement la prolifération des myoblastes et facilite le passage à la différenciation (Zhang et al., 2009).

En ce qui concerne la fusion, nous noterons que cette étape n'est pas spécifique aux myoblastes/myotubes, et que nous pouvons la retrouver dans différents contextes tels que les infections virales ou l'exocytose (Hernández et al., 2017). Dans le cas des myoblastes/myotubes, la fusion est régulée par des protéines spécifiques telles que TGF $\beta$  dont la signalisation réduit la fusion cellulaire (Girardi et al., 2021; Melendez et al., 2021), ou d'autres protéines qui sont plutôt essentielles à la fusion et qui ont été récemment découvertes telles que la myomaker et la myomerger, aussi appelées TMEM8c et myomixer respectivement

(Bi et al., 2018; Douglas P. Millay et al., 2016; Douglas P Millay et al., 2013; Prasad et al., 2021).

De plus, d'autres protéines du myoblaste jouent des rôles très importants dans ces processus telles que les protéines costamériques qui font partie du complexe dystroglycan et du complexe d'adhérence intégrine. Plus précisément, il s'agit de l' $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , et  $\delta$ -sarcoglycan,  $\beta$ -dystroglycan, la taline, la vinculine et l'intégrine  $\alpha_7\beta_1$ . Une étude a montré que ces protéines étaient globalement distribuées autour du noyau dans les myoblastes non-différenciés au départ et se déplacent graduellement vers la membrane au cours de la différenciation (Trimarchi et al., 2006). Les filaments intermédiaires, et principalement la desmine qui est le premier FI à être produit par les myoblastes différenciés, restent dispersés dans le cytosquelette autour du noyau sans organisation spécifique (Costa, 2014). La desmine joue un rôle déterminant dans la rigidité cellulaire globale, même si ce rôle est négligeable au niveau du cortex cellulaire. Plus particulièrement, la desmine participe à la viscoélasticité du cytoplasme (Charrier et al., 2018). Elle est également impliquée dans l'adhérence et la vitesse de migration des myoblastes. D'ailleurs, une étude récente a montré qu'une perturbation des desmines entraîne des dysfonctionnements dans l'adhésion et la migration de ces cellules (Hakibilen et al., 2022). Cependant, la desmine n'a pas d'impact sur la prolifération, la différenciation et la fusion des myoblastes (Z. Li et al., 1997).

D'autres protéines du cytosquelette sont présentes dans les myoblastes et jouent un rôle important lors de la myogénèse. Parmi elles, la troponine (avec ses différents isoformes, C, I et T) qui joue un rôle dans la coordination de l'assemblage des protéines de l'appareil contractile lors de la fusion (Bucher et al., 1988), la tropomyosine qui dicte les étapes fondamentales de la myogénèse avant de réguler la contraction dans le sarcomère (Williams et al., 2015) et la nébuline qui apparaît au début du processus de fusion et est connue d'un côté pour être une règle ou un échafaudage pour l'actine lors de la formation et la régulation de la longueur des filaments fins (Behr et al., 1994; Komiyama et al., 1992), et de l'autre côté pour être un promoteur de l'interaction actine-myosine (Bang et al., 2015).

Plus spécifiquement au sujet de la dystrophine, une étude montre que les SCs activées présentes sur des fibres cultivées ex-vivo expriment la dystrophine, qui a d'ailleurs un rôle dans la polarité et les divisions asymétriques de ces SCs (Dumont, Wang, et al., 2015), tandis que d'autres montrent que les myoblastes en culture n'expriment pas de dystrophine (Huard et al., 1991; Miranda et al., 1988), ce qui a été confirmé par nos images en microscopie confocale de marquage de la dystrophine sur des myoblastes issus de rats WT (Figure 29.d).

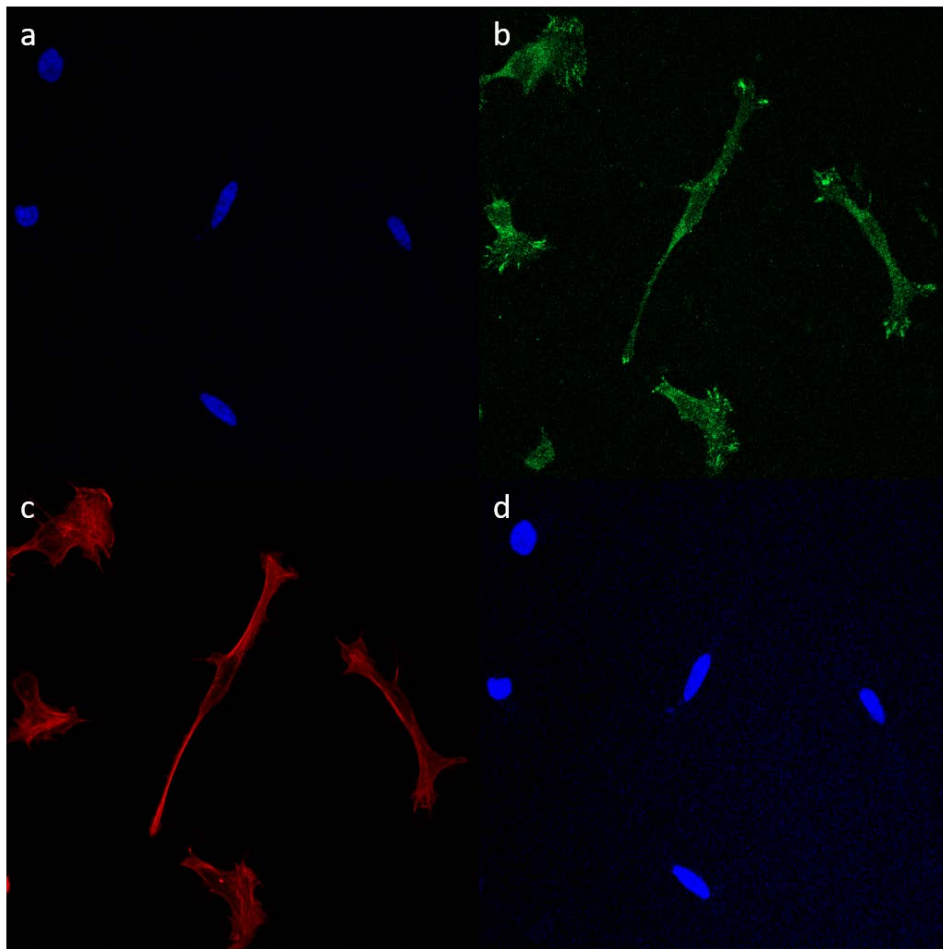


Figure 29 : Image d'immunomarquage de myoblastes WT acquise par microscopie confocale ( $\times 40/1.4$  à huile). a. Noyaux marqués au DAPI (bleu). b. Paxilline marquée par un anticorps anti-paxilline (vert). c. Actine marquée à la rhodamine phalloïdine (rouge). Noyaux marqués au DAPI (bleu) + Dystrophine marquée par un anticorps anti-dystrophine (Bleu-violet).

### 3.1.6. **Myotubes :**

Le myotube est un syncytium multinucléé issu de la fusion des myoblastes (C. F. Bentzinger et al., 2012; Dias et al., 1994; Hernandez-Torres et al., 2017). A la fin de l'étape de différenciation, les myotubes expriment principalement Myf6 et différentes protéines de la myosine à chaînes lourdes (*Myosin heavy chains MHC*) (Figure 27). Ceci leur permet de mûrir en se transformant en fibres musculaires grâce à une réorganisation de leur cytosquelette et au repositionnement de leurs noyaux en noyaux périphériques (C. F. Bentzinger et al., 2012). Nous noterons qu'il est possible de différencier les myoblastes en myotubes *in vitro* (Voir section Matériel et méthodes) (Sincennes et al., 2016).

Au vu de ce qui a été décrit précédemment sur la myogénèse, il apparaît que la structure du cytosquelette des myoblastes est moins bien organisée comparée à celle des myotubes qui elle-



même est moins bien organisée que la structure de la fibre musculaire. De ce fait, des changements drastiques doivent s'opérer lors de la fusion et la différenciation des myoblastes (Costa, 2014). Il est donc attendu que le moindre défaut dans la structure des myoblastes impacte le processus de formation et la maturation des myotubes (Berendse et al., 2003).

Ces changements de structure au cours de la différenciation des myoblastes en myotubes ainsi que la structure exacte des myotubes sont assez peu définis étant donné que le myotube est une étape intermédiaire entre le myoblaste et la formation de la fibre musculaire.

Concrètement, les grands changements de structure commencent juste avant le début de la fusion. En effet, les filaments d'actine qui étaient organisés de façon longitudinale et parallèle le long des myocytes, forment des protrusions qui sont nécessaires à la fusion et au recrutement de protéines fusogènes (Shilagardi et al., 2013). Les myoblastes commencent ensuite à sous-réguler la MyoD et à exprimer la myogénine. Ceci leur permet d'exprimer des isoformes de protéines spécifiques au muscle tels que l'actine  $\alpha$  squelettique, la myosine (principalement à chaînes lourdes mais aussi à chaînes légères), l' $\alpha$ -actinine, la tropomyosine et la troponine. (Dumont, Bentzinger, et al., 2015; J. Lin et al., 1986). Au début de la myofibrillogenèse, les disques M se forment (Kontogianni-Konstantopoulos et al., 2006), puis le premier composant des disques Z, l' $\alpha$ -actinine, apparaît de façon orthogonale le long de structures d'actine qui ressemblent aux fibres de stress sur les précostamères (costamères prématurés, principalement les complexes intégrines). Après cela, des minuscules bandes A composées de myosine II non-musculaire se superposent aux filaments d'actine entre ces disques Z afin de former des minuscules sarcomères. Par la suite, la titine et les filamines C se lient aux disques Z et servent d'échafaudages à la formation des filaments épais et fins respectivement. Les filaments épais remplacent la myosine non-musculaire avec la myosine musculaire qui se divise en 4 myosines à chaînes légères et 2 myosines à chaînes lourdes (MyhC) et s'attachent aux lignes M. De l'autre côté, les filaments d'actine reliés aux disques Z recrutent des protéines comme la nébuline, la tropomyosine et la troponine pour former les filaments fins et on obtient donc des myofibrilles naissantes (Figure 28). Ces myofibrilles naissantes s'accroissent en longueur pour former les myofibrilles (Nguyen et al., 2016; Prill et al., 2020; Sparrow et al., 2009)

Les microtubules sont organisés de façon radiale dans les myoblastes mais commencent à avoir, eux aussi, une organisation longitudinale lors de l'élongation des myoblastes. Ces microtubules jouent un rôle crucial dans l'organisation des noyaux au sein du myotube. Certes, les filaments d'actine ainsi que les filaments intermédiaires jouent un rôle dans le mouvement des noyaux et leur positionnement mais ce sont les réseaux de microtubules qui sont les premiers responsables

(Cadot et al., 2015). En effet, contrairement aux fibres musculaires, qui elles ont des noyaux périphériques, les myotubes naissants présentent des noyaux positionnés au centre de la cellule (Nakai, 1969). Après la fusion, les noyaux se dirigent rapidement vers le centre du myotube (0.88  $\mu\text{m}/\text{min}$ ). Ce mouvement s'accompagne d'un transfert du centre d'organisation des microtubules du centrosome vers l'enveloppe nucléaire (Warren, 1974). Grâce à cet ancrage, ainsi que leur capacité de polymérisation, les microtubules peuvent exercer des forces sur les noyaux en les poussant ou en les tirant. Ces forces peuvent aussi être appliquées par le complexe dynéine/dynactine et la protéine Par6 associés aux microtubules (Cadot et al., 2012). Après cela, les noyaux commencent à se mouvoir le long des microtubules avec une vitesse de 0.2  $\mu\text{m}/\text{min}$  pour s'espacer (Englander et al., 1987), et de ce fait, déplacent la zone d'influence de chaque noyau, ou ce qu'on appelle le domaine nucléaire (Hall et al., 1989). Au cours de la maturation, ces noyaux se déplacent vers la périphérie mais le mécanisme qui régit ce phénomène est toujours en cours d'investigation (Pastoret et al., 1995). Toutefois, des études ont montré que ces noyaux, une fois à la périphérie, se clustérisent en partie autour des jonctions neuromusculaires, ce qui suppose que ce mouvement vers la périphérie est régi par un facteur spécifique lié à cette jonction (Bruusgaard et al., 2003).

Concernant plus spécifiquement les filaments intermédiaires, la desmine est principalement décrite dans le myotube. Elle se réorganise lors de la différenciation en myotubes autour des sites d'adhérence et des costamères et n'intervient pas particulièrement dans la myogenèse (Costa, 2014).

En ce qui concerne la dystrophine, elle n'est pas exprimée dans les myoblastes, même si elle est exprimée dans les SCs (Dumont, Wang, et al., 2015), mais elle est graduellement exprimée dans les myotubes fusionnés au fur et à mesure de la fusion/maturation. En effet, de faibles traces de dystrophine sont observées dans les myotubes naissants mais cette expression augmente lors de la maturation. Les myotubes adultes expriment donc fortement cette protéine localisée à leur périphérie. L'expression de la dystrophine a été fortement corrélée à la force exercée par les myotubes, notamment par microscopie à force de traction (B. Li et al., 2008).

### 3.2. Maladies neuromusculaires, myopathies et dystrophie musculaires :

Les maladies neuromusculaires regroupent les pathologies dues à un dysfonctionnement des nerfs périphériques et/ou du muscle. Actuellement, on trouve plus de 700 maladies neuromusculaires (Cohen et al., 2021). Ces pathologies peuvent affecter des structures allant du corps cellulaire des neurones périphériques ou de leurs axones, des cellules de Schwann, des

jonctions neuromusculaires, les fibres musculaires, leur environnement comme les fibroblastes qui sécrètent la matrice extra-cellulaire, les cellules inflammatoires, le réseau vasculaire ou les cellules satellites, voire toucher une combinaison de ces différents sites (Morrison, 2016). De ce fait, il existe plusieurs types de maladies neuromusculaires, les dystrophies musculaires, les dystrophies musculaires congénitales, les myopathies congénitales, les myopathies distales, les autres myopathies, les Syndromes myotoniques, les maladies des canaux ioniques des muscles, les hyperthermies malignes, les myopathies métaboliques, les cardiomyopathies héréditaires, les syndromes myasthéniques congénitaux, les SMA (atrophie musculaire spinale) et maladies des motoneurons, mes ataxies héréditaires, les neuropathies motrices et sensorielles héréditaires, les paraplégies héréditaires et les autres troubles neuromusculaires (Cohen et al., 2021).

Plus généralement, les maladies neuromusculaires qui ciblent principalement le muscle, sont appelées myopathies, du grec « myo » qui veut dire muscle et « patheia » qui veut dire souffrance. Parmi ces myopathies, on retrouve les dystrophies musculaires qui sont notre sous-groupe d'intérêt.

Les dystrophies musculaires sont des maladies musculaires héréditaires et dégénératives provoquant des faiblesses musculaires progressives. Elles sont fréquemment dues à des mutations génétiques de certains gènes qui codent pour des protéines spécifiques du muscle et, qui ont pour conséquence d'induire une dégénérescence des fibres musculaires et l'apparition d'une fibrose (M Lekka et al., 2014). Il existe plus de 30 dystrophies musculaires différentes (Wilson et al., 2017). Elles sont définies en fonction du type de muscle atteint, de l'âge auquel apparait la maladie, de la dynamique de progression de la maladie et des gènes responsables (Mercuri et al., 2019). Parmi les dystrophies les plus fréquentes et emblématiques on trouve la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) et la Dystrophie Musculaire de Becker (BMD). Ces deux pathologies sont dues, respectivement, à une absence ou à une troncation de la dystrophine à des degrés variés (M Lekka et al., 2014). Dans notre étude, nous nous sommes principalement intéressés à la DMD.

### 3.3. Dystrophie musculaire de Duchenne :

La dystrophie musculaire de Duchenne est une myopathie génétique, rare et progressive due à l'absence de la protéine dystrophine dans les cellules musculaires. Cette dystrophie est due à des mutations génétiques retrouvées au niveau du gène DMD codant pour la dystrophine (Duan et al., 2021). Ce gène, qui se révèle être le plus grand gène connu du corps humain (79 exons et

2,6 Mb) (Koenig et al., 1987), est localisé sur le chromosome X. Cette spécificité implique que cette maladie touche principalement les garçons (Aartsma-Rus et al., 2006). En effet, la prévalence de cette maladie est d'environ 10 cas pour 100000 garçons avec une incidence d'1 cas pour environ 3500 à 5000 nouveau-nés et inférieur à 1 cas par million de filles. Ces chiffres diffèrent bien-sûr d'un pays à l'autre (Erkut et al., 2022; Mendell et al., 2012; Ryder et al., 2017).

Les études génétiques ont identifié plus de 7000 mutations génétiques, qui provoquent la DMD. Parmi celles-ci, on trouve dans 65% des cas des délétions, 13% des duplications et le reste à des mutations ponctuelles, des micro-délétions ou des insertions ainsi que des dérèglements lors de l'épissage (Figure 30.A). 47% de ces mutations sont situées entre l'exon 45 et l'exon 55 aussi appelé « point chaud » (Figure 30.B). Le deuxième point chaud se trouvant entre l'exon 3 et l'exon 9 avec 7% des mutations (Ankala et al., 2012; Duan et al., 2021; Magri et al., 2011; A. Nakamura et al., 2017).

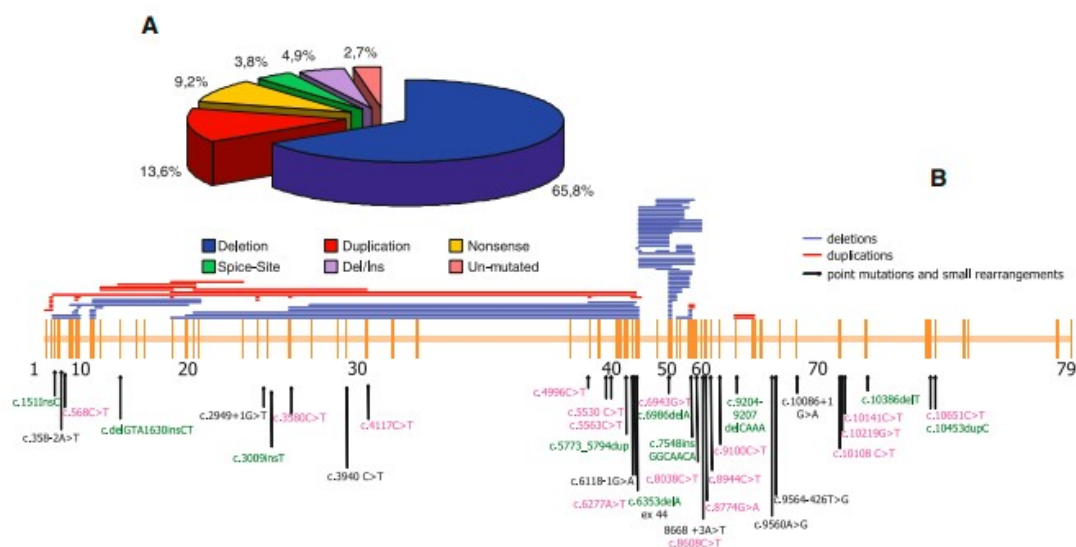


Figure 30 : *Caractéristiques moléculaires de la DMD.* A. Fréquences relatives des différentes mutations de la DMD dans la population de patients DMD. B. Distribution des mutations le long du gène DMD. Les délétions (bleu) et les duplications (rouge) sont cartographiées dans la partie supérieure de la figure. Les flèches indiquent les mutations ponctuelles (mutations non-sens en rose, petites insertions/délétions en vert, et mutations d'épissage en noir). Adapté de (Magri et al., 2011)

Cette maladie a été décrite en détail en 1858 par Guillaume Duchenne de Boulogne, d'où le nom donné à celle-ci (Duchenne, 1858). Les signes cliniques de cette maladie ne sont en général pas identifiés à la naissance (Falzarano et al., 2015). Dans la majorité des cas, les premières manifestations apparaissent entre l'âge de 2 et 5 ans et le diagnostic est généralement posé avant 8 ans. A cet âge-là, l'enfant présente des signes d'une faiblesse musculaire (signes de Gowers), des difficultés à monter les escaliers, à courir, à se maintenir debout, chute fréquemment avec

des difficultés à se relever. (Mercuri et al., 2019). Des troubles cognitifs sont observés dans 30% des cas (Ricotti et al., 2016). Ces symptômes s'accroissent dès l'âge de 7 ans et s'accompagnent d'une dégénérescence et d'une perte musculaire. Ceci entraîne des difficultés à marcher et conduit à l'utilisation d'un fauteuil roulant à partir de 10 ans à 12 ans. Puis, progressivement, la maladie s'étend à l'ensemble de la musculature et conduit à l'utilisation d'une ventilation assistée au cours de l'adolescence ou chez le jeune adulte. Malheureusement, ces patients décèdent généralement entre 20 et 40 ans de déficiences respiratoires ou cardiaques (Mercuri et al., 2019). Grâce aux progrès réalisés sur le plan du diagnostic, du traitement, de la caractérisation et de l'évaluation de la maladie au cours de la vie du patient, l'espérance de vie est passée de 25 ans pour les patients nés avant 1970 à 41 ans pour ceux nés après cette année (Kieny et al., 2013). Le diagnostic de la DMD se fait dès l'apparition des premiers symptômes décrits précédemment. Tout d'abord, les médecins vérifient le taux de créatine kinase plasmique (CK), marqueur de la nécrose musculaire. Dans le cas de la DMD, celui-ci est au minimum 10 à 20 fois plus élevé que le taux normal (Yiu et al., 2015). Cependant, ce taux de CK est une condition nécessaire mais non suffisante au diagnostic de la DMD. Celui-ci doit être confirmé par une identification de la mutation impliquée qui se fait principalement par amplification multiplex de sondes dépendantes d'une ligation (MLPA) (Janssen et al., 2005). Si aucune mutation n'est détectée, une biopsie est effectuée afin de déterminer la présence ou non de la dystrophine dans le muscle ainsi que sa quantité et sa localisation. Ces mesures se font principalement par immunomarquage ou par western blot (Duan et al., 2021). On peut rajouter à ces techniques l'étude des antécédents familiaux ainsi que d'autres techniques telle que l'électromyogramme.

Malheureusement, malgré tous les efforts qui ont été consentis au cours des dernières décennies, aucun traitement de la DMD n'a été mis au point. Seuls des traitements symptomatiques existent dont l'objectif est de ralentir la progression de celle-ci. Parmi ces traitements, on trouve principalement les glucocorticoïdes qu'il est conseillé de prescrire à partir de 4 à 5 ans, c'est-à-dire lorsque le développement moteur diminue ou s'arrête (Buddhe et al., 2018). Bien que le mécanisme sous-jacent à ce traitement ne soit pas très bien connu, il est décrit que son action permet d'augmenter la force musculaire, de diminuer l'inflammation et la production de cytokine, d'améliorer la prolifération des myoblastes et de retarder la perte de la mobilité et de la fonction pulmonaire et cardiaque (Angelini et al., 2012). L'utilisation des glucocorticoïdes provoque beaucoup d'importants effets secondaires tels que la rétention d'eau, l'hypertension, une atrophie de la peau et une augmentation de la masse corporelle (Jaisser et al., 2016). De ce

fait, aboutir à un ralentissement optimal de la maladie et à une meilleure qualité de vie nécessite de traiter cette maladie de façon multidisciplinaire à la fois sur le plan médical, chirurgical et de la réhabilitation (Messina et al., 2018). Cela se traduit par la prescription d'un traitement aux glucocorticoïdes couplé à de la physiothérapie pour maintenir la force et la flexibilité des muscles, à l'utilisation d'appareils orthopédiques afin de contrôler la scoliose et maintenir la mobilité, à l'administration de compléments alimentaires à base de calcium ou de vitamine D pour le maintien de la densité des os, à l'utilisation de la ventilation assistée voire des stimulateurs cardiaques lorsque le patient est en fin de vie. L'ensemble de ces dispositifs est accompagné d'un suivi nutritionnel, psychologique et même endocrinien du patient (Gieron-Korthals et al., 2020; Yiu et al., 2015). En parallèle de ces traitements symptomatiques proposés à l'heure actuelle, beaucoup d'autres approches thérapeutiques ont également été développées telles que les thérapies cellulaires, les thérapies géniques, les pharmacothérapies comme PTC124 (Ataluren) (Bushby et al., 2014), les approches de stabilisation des jonctions neuromusculaires et des fibres, les approches de régulation à la hausse des molécules de soutien du sarcolemme tels que l'utrophine ainsi que les approches d'ingénierie tissulaire (Heydemann et al., 2023; Chengmei Sun et al., 2020; Wilton-Clark et al., 2023).

Les premières approches thérapeutiques développées ont été les approches de thérapie cellulaire. Celles-ci sont basées sur la transplantation, principalement de cellules souches, hétérologues (issues de donneurs sains histocompatibles) ou autologues (issues du patient lui-même et ayant subies une correction génétique). L'objectif de cette approche thérapeutique consiste à reconstituer un ensemble de myoblastes qui fusionnent afin de restaurer les fibres musculaires qui produisent une dystrophine fonctionnelle et donc qui restaurent la fonction musculaire. Cependant, plusieurs types de cellules souches peuvent être utilisés, les cellules satellites ou les myoblastes, les cellules de la moelle osseuse, les péricytes ou les cellules mésenchymateuses (Congshan Sun et al., 2020). Cependant, la mise en place de cette technique et son efficacité se heurtent à la proportion de muscles dans le corps qui s'élève à 30% ainsi qu'au nombre important de muscles individuels (Duan et al., 2021). D'ailleurs, un essai clinique à l'aide de mesoangioblastes a été effectué et n'a pas abouti avec seulement 1 patient DMD sur 5 où on a observé une expression de dystrophine (Cossu et al., 2015). De ce fait, la majorité des laboratoires ont abandonné cette approche pour la DMD, même si elle peut se révéler utile pour des myopathies qui touchent un nombre plus réduit de muscles (OPMD par exemple).

Quant à la thérapie génique, celle-ci consiste à transférer aux tissus affectés une copie fonctionnelle du gène de la DMD ou des outils pour corriger les mutations de celui-ci (C. Li et

al., 2020). Ce transfert se fait principalement via des adénovirus non pathologiques qui présentent une grande affinité pour les muscles squelettiques et cardiaques ou plus récemment par des vésicules lipidiques (Duan et al., 2021). Plusieurs stratégies sont utilisées. Parmi elles le remplacement de gène, une technique qui consiste à introduire un gène de DMD fonctionnel. Cependant, du fait de la grande taille du gène DMD, il est difficile de le transférer par adénovirus dont la taille ne permet pas l'intégration de constructions de plus de 4.7kb. Une nouvelle stratégie proposée consiste à introduire des gènes codants pour des protéines plus petites telles que la micro-dystrophine (Duan, 2018). Une autre stratégie propose de modifier le gène lui-même grâce à la technique de l'édition génétique CRISPR/Cas9 qui permet d'effectuer un saut d'exon (Jinek et al., 2012). Cela permet d'aboutir à une dystrophine partiellement fonctionnelle et d'avoir un phénotype proche de celui de la dystrophie musculaire de Becker (Guiraud et al., 2015). D'autres thérapies géniques cherchent à compenser l'absence de la dystrophine en ciblant d'autre protéine telle que l'utrophine par modification du génome. Cette dernière est connue pour avoir une structure similaire à la dystrophine et se révèle avoir un potentiel thérapeutique très prometteur (Guiraud et al., 2018; K. Sengupta et al., 2020).

### 3.3.1. *Suivi et caractérisation de la DMD :*

Caractériser la DMD, son évolution et l'efficacité de ces traitements nécessitent de disposer d'outils et/ou de marqueurs qui permettent un suivi précis et quantitatif de la maladie, de sa progression et de l'impact des traitements. (Wagner et al., 2021). Les outils de diagnostic actuels, tels que la mesure du taux de créatine kinase ne peuvent pas être utilisés à cet effet, car celle-ci diminue avec l'âge indépendamment de la maladie et est très variable (Sumien et al., 2018). De plus, faire une analyse invasive, notamment une biopsie, à un patient qui souffre déjà d'une perte musculaire est difficile à justifier auprès des autorités réglementaires.

Actuellement, la fonction musculaire est évaluée par des tests fonctionnels comme le test de marche de 6 minutes. En mesurant la distance que le patient peut parcourir en six minutes à différents temps, il permet de quantifier et de surveiller la progression de la maladie (McDonald et al., 2013). Des tests de préhension qui consistent à mesurer la force musculaire dans différentes parties du corps sont également utilisés (Hogrel et al., 2020; Lerario et al., 2012). En complément, des tests de la fonction cardio-respiratoire tels que l'échocardiogramme ou l'électrocardiogramme (Birnkrant et al., 2018) ou encore la mesure de la capacité vitale forcée (CVF), qui consiste à mesurer le volume d'air que le patient peut expirer en une seule inspiration maximale forcée (Finder et al., 2017) sont également proposés aux patients. D'autres techniques non invasives, basées sur l'imagerie, voient le jour comme l'imagerie par résonance magnétique

(IRM) ou l'élastographie par ultrasons à ondes de cisaillement. L'IRM est une technique utilisée pour évaluer la taille et la forme des muscles ainsi que leur composition, à savoir la distribution de la graisse (lipides) et de la fibrose dans le tissu musculaire (Arpan et al., 2014). L'élastographie ultrasonore, quant à elle, est une technique qui consiste principalement à mesurer la rigidité des muscles (notamment la jambe et le diaphragme). Elle permet de caractériser les propriétés viscoélastiques des muscles statique et dynamique, et par ce fait, d'en déduire des propriétés physiopathologiques (Flatres et al., 2020; Lacourpaille et al., 2017; C.-W. Lin et al., 2021)

### 3.3.2. *Impact de l'absence de la dystrophine sur la structure du muscle squelettique :*

La dystrophine est une protéine essentielle pour la stabilité du sarcolemme et par le fait pour le fonctionnement des cellules musculaires. Elle relie le cytosquelette d'actine à la matrice extracellulaire via le complexe protéique dystrophine-glycoprotéine (DGC), qui régule l'intégrité structurelle de la membrane. L'absence de la dystrophine altère donc le DGC, ce qui entraîne une instabilité de la membrane des cellules musculaires et une fragilité du muscle. Des études ont examiné l'impact de l'absence de la dystrophine sur les protéines du cytosquelette musculaire à différents stades de la régénération musculaire. Les cellules satellites expriment la dystrophine. Celle-ci est fortement liée à la régulation de la polarité de ces cellules et de leur division asymétrique. De ce fait, une absence de cette protéine provoque une perte de cette polarité, une réduction du nombre de divisions asymétriques et au final une réduction de la génération de cellules myogéniques progénitrices. D'autre part, la perte musculaire observée chez les patients DMD n'est pas entièrement due à la fragilité des fibres, mais est peut aussi être lié au dysfonctionnement intrinsèque des cellules satellites (Dumont, Wang, et al., 2015).

Contrairement aux cellules satellites, les myoblastes activées en culture n'expriment pas, ou faiblement, la dystrophine. Cependant, ils jouent un rôle important dans la régénération des tissus musculaires endommagés, essentiellement au début de la maladie. A ce propos, il a été reporté que l'absence de dystrophine induit des défauts de fusion, un retard de différenciation et une capacité réduite de former des myotubes puis des fibres musculaires (Luz et al., 2002). Ces défauts ont été associés à des problèmes de voies de signalisation intracellulaires. Par exemple, le gène Wnt, qui joue un rôle très important dans la myogenèse, est dérégulé dans le cas de la DMD (F. Liu et al., 2016; von Maltzahn et al., 2012). Le TGF  $\beta$ 1 qui inhibe la différenciation, est également surexprimé dans le cas de la DMD (Kemaladewi et al., 2012; D. Liu et al., 2001). Par ailleurs, le Ryr1, qui sert d'intermédiaire à la libération de  $Ca^{2+}$  par le



réticulum sarcoplasmique, est sous-régulé dans la DMD. Par conséquent, il influe fortement sur la myogenèse (Meyer et al., 2021).

De plus, au niveau des myotubes l'absence de dystrophine conduit à des défauts de fusion avec peu de myotubes, ou des myotubes plus petits, moins matures, moins alignés avec des noyaux moins excentrés et moins alignés ont été décrits (Meyer et al., 2021; Nesmith et al., 2016; Taglietti et al., 2023; Xu et al., 2018). Des études ont également montré une augmentation de l'activité calcique à cause de l'augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux de fuite (Fong et al., 1990), une perte de contractilité (Yoshioka et al., 2021) et des lésions au niveau du sarcolemme et donc des fibres (Lynch et al., 2000; Mokri et al., 1975).

Pour comprendre l'impact de l'absence de la dystrophine sur la fibre musculaire, il est utile au préalable de décrire l'organisation des protéines situées autour de la dystrophine. Comme la montre la Figure 31, à l'échelle de la fibre musculaire mature, la dystrophine est reliée d'un côté aux protéines du cytosquelette et de l'autre à des protéines transmembranaires et au sarcolemme. Parmi les protéines du cytosquelette, on trouve principalement la  $\gamma$  actine, qui est reliée aux disques Z et donc aux sarcomères d'un côté et à la dystrophine à travers son domaine de liaison d'actine (ABD) ou les domaines répétitions de type spectrine R11-R15 d'un autre côté. La liaison microtubule-dystrophine se fait via son domaine tige R4-R15 ou R20-R23. On trouve aussi d'autres protéines du cytosquelette telles que l' $\alpha$ -actinine, la desmine ou la plectine qui se lient au terminal C. Parmi les protéines transmembranaires on trouve le  $\beta$  dystroglycane et l'intégrine (à laquelle la dystrophine est reliée indirectement à travers la  $\gamma$  actine ou des protéines de signalisations comme les syntrophines). Le sarcolemme lui, est lié à la dystrophine via le domaine riche en cystéine CR, le domaine C-terminal ou les domaines R1-R3 ou R10-R12. La DMD impacte également la structure des microtubules au sein de la fibre musculaire. Ceux-ci étant organisés en grille dans un modèle sain, l'absence de la dystrophine désorganise ce réseau en augmentant le taux d' $\alpha$  et  $\beta$  tubuline par un facteur 2,5 (Prins et al., 2009).

L'absence de dystrophine impacte aussi l'expression de quelques protéines telles que l'utrophine, la desmine ou la paxilline. L'utrophine est une protéine assez similaire à la dystrophine dans le sens où elle relie le cytosquelette d'actine à des complexes de glycoprotéines sarcolemmales. L'absence de dystrophine est compensée par une surexpression de l'utrophine, ce qui améliore certains phénotypes de la maladie et lui confère un potentiel thérapeutique. Cependant, il a été aussi montré que cette protéine n'arrive ni à réguler l'expression des nNOS à la membrane ni à améliorer l'organisation du réseau de microtubules complètement déstructuré, ce qui indique que, pour l'instant, l'utrophine ne peut pas

complètement compenser l'absence de la dystrophine (Belanto et al., 2014), et les essais cliniques basés sur l'induction de l'Utrophine ont échoué. Des études ont également montré que la desmine est régulée à la hausse dans le cas de souris mdx. Ceci soutient l'hypothèse que la perte de dystrophine est partiellement compensée par un renforcement du réseau de filaments intermédiaires qui permet de mieux stabiliser et protéger les fibres (Banks et al., 2014; Lewis et al., 2010). Au niveau des costamères, on observe une surexpression de la paxilline qui vient compenser l'absence de dystrophine en augmentant la présence des sites d'adhérences focales (voir résultats) (Sen et al., 2011).

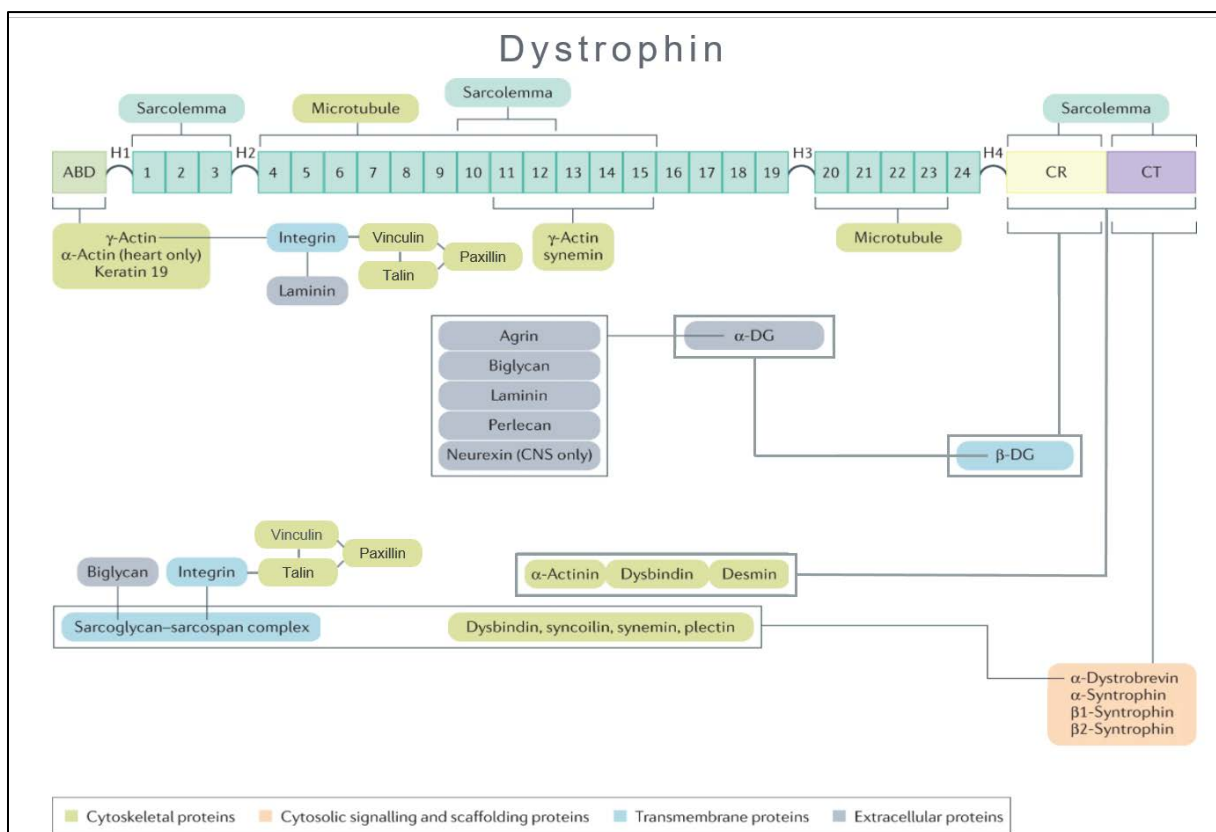


Figure 31 : **Dystrophine et ses partenaires de liaison.** Les partenaires de liaison avec la dystrophine peuvent être classés en protéines cytosquelettiques, protéines transmembranaires, protéines extracellulaires et protéines de signalisation cytosoliques et d'échafaudage. ABD, domaine liant l'actine ; CNS, système nerveux central ; CR, domaine riche en cystéine ; CT, domaine C-terminal ; DG, dystroglycan. Adapté de (Duan et al., 2021)

L'absence de dystrophine a un effet prononcé sur l'échelle du tissu musculaire. Celui-ci est spécialisé pour la contraction et constitue la base du mouvement du corps, de la ventilation et du pompage du sang (Duan et al., 2021). Une absence de la dystrophine à cette échelle entraîne non seulement une perturbation complète de la structure et de l'intégrité des fibres musculaires, mais aussi des dysfonctionnements de nombreuses fonctions du corps humain. Des études ont montré des déchirures sarcolemmateuses (lésions dites « delta ») qui ont été détectées par

microscopie électronique dans les muscles de patients atteints de DMD (Mokri et al., 1998). Par ailleurs, il a été montré que dans les phases précoces de la maladie, le muscle dégénéré est réparé suivant le processus de régénération. Cependant, dans les phases ultérieures, les cellules musculaires mortes finissent par être remplacées par des tissus adipeux et fibrotiques en raison de l'altération de la capacité de régénération des cellules satellites et de la régulation à la hausse du TGF $\beta$  dans le milieu inflammatoire chronique du muscle DMD (Rosenberg et al., 2015). Cette modification, comme on le verra, altère fortement les propriétés mécaniques du muscle.

### 3.3.3. *Propriétés mécaniques du muscle sain et dystrophique :*

La caractérisation des propriétés mécaniques des modèles DMD murins ou humains a été rapportée dans un certain nombre d'études. Nous avons choisi de présenter les résultats de ces études sous la forme de tableau (présenté ci-dessous) afin que la comparaison avec nos propres résultats lors de la discussion de ce manuscrit en soit simplifiée.

Dans cette étude, nous avons présenté les résultats mécaniques, en mettant principalement l'accent sur la rigidité, à différentes échelles biologiques allant des myoblastes aux muscles complets, en passant par les myotubes, les fibres et les sections musculaires. Nous avons choisi des études utilisant les mêmes techniques que celles que nous avons employées, à savoir la microscopie à force atomique et l'élastographie ultrasonore. Nous avons inclus une étude utilisant l'élastographie par résonance magnétique à titre indicatif. De plus, nous avons exposé des mesures réalisées sur différents modèles (souris, rats, humains, groupe témoin et DMD) à différents stades de développement de la maladie.

A l'échelle du myoblaste, nous constatons que les mesures de rigidité se situent généralement entre 7 et 11 kPa. Pour les myotubes, la rigidité varie entre 9 et 45 kPa. À l'échelle de la fibre musculaire, les mesures présentent une variation plus importante, allant de 0,4 kPa à 100 kPa. Cela est dû à l'utilisation de fibres provenant de différents muscles tels que l'EDL, le soleus et le FDB, ainsi que différents modèles incluant des souris C57, des souris mdx, des rats et des humains, de différents âges. Concernant les sections musculaires d'environ 100  $\mu$ m de diamètre, les résultats montrent une variation de rigidité moins marquée, allant de 1,4 kPa à 18 kPa. À cette échelle, de nombreuses études ont été réalisées sur des modèles de DMD. Enfin, à l'échelle du muscle complet, une grande hétérogénéité des résultats est observée, allant de 3,55 kPa à 258 kPa. Cette hétérogénéité peut être expliquée par la diversité des paramètres expérimentaux, des modèles utilisés, des âges des sujets et des positions des muscle

Tableau 1 : Revue des mesures de rigidité effectuée sur plusieurs échelles du muscle : Myoblastes, myotubes, fibres musculaires, sections de muscle, muscle en entier. Ces mesures ont été réalisées à l'aide de plusieurs techniques, la microscopie à force atomique AFM, l'élastographie ultrasonore UE et l'élastographie à résonance magnétique.

Modèle	Echelle biologique	Détails	Technique	Module d'élasticité (kPa)	Autre propriété	Article
C2C12 (ATCC)	Myoblastes Myotubes	Colchicine 2h Taxol 2h Cytochalasine D 5-30 min"	AFM (Bioscope) Pointe pyramidale avec un angle d'ouverture de 35°	Myoblastes : 11,5 ± 1,37 kPa Myotubes jour 8 : 45,3 ± 47 kPa Pas de données quantitatives lors de l'utilisation de la drogue.		Amy m. collinsworth & al, 2002
C2C12 (ATCC)	Myoblastes		AFM (Bruker, Santa Barbara, USA)	Myoblastes : 10.26 ± 0.74 kPa		Bin Liu & al, 2020
C2C12 (ATCC)	Myoblastes		AFM (NanoScope IIIa BioScope, Veeco, CA, USA) Pointe pyramidale avec un angle d'ouverture de 35°	Myoblastes : 11 ± 1 kPa		Takemoto & al, 2012
C2C12 (ATCC)	Myoblastes		AFM (Nanowizard II, JPK Instruments, Germany) Pointe PNP-TR-50 cantilevers (Nanoworld)	Myoblastes : 7 kPa		Al-Rekabi & al, 2013
C2C12 (ATCC)	Myotubes		AFM (Bioscope, (Digital Instruments Inc., Santa Barbara, CA) Pointe pyramidale avec un angle d'ouverture de 35°	Myotubes après 2 jours de différenciation : 24.77 ± 3,5 kPa		Anshu B. Mathura & al, 2001
Souris femelles 3 mois	Fibres isolées de muscles Soleus et EDL.		AFM (NanoWizard 3, JPK Instruments, Berlin, Germany) Pointe conique	Fibre WT : * Soleus : 100 kPa  * EDL :46,5 kPa	Taille du sarcomère	Malek Kammoun & al, 2019

Modèle	Echelle biologique	Détails	Technique	Module d'élasticité (kPa)	Autre propriété	Article
Souris WT (C57) et mdx  Age : 1 à 2 mois	Fibres musculaires en culture 6 jours après isolation issus muscle FDB		AFM (5500ILM, Argilent technologies)  Pointe pyramidale avec un angle d'ouverture de 35°	C57 WT : E = 8 ± 1 kPa  mdx : E = 12.5 ± 2 kPa		M. Canato & al, 2010
Rats Wistar WT de 2 mois	Fibre isolée du muscle Soleus	Milieu de Relaxation  Membrane perméabilisée.	AFM (NT-MDT, Moscow, Russia) avec une tête Olympus Corporation, Tokyo, Japan  - Pointe pyramidale d'un angle d'ouverture de 22°	Disques Z : 39 ± 4 kPa  Lignes M : 30 ± 2 kPa  M – Z : 22 ± 2 kPa	Taille du sarcomère	Irina V. Ogneva & al, 2010
Souris males jeunes adulte âgées de 30 jours à 70 jours	Fibres isolées Muscle Flexor Digitorum Brevis (FDB)	Coating : Laminin de souris.	AFM (BioScan, Molecular Imaging Corp)  Pointe pyramidale avec angle d'ouverture de 35°.	Fibre musculaire : E = 61 ± 5 kPa	Taille du sarcomère	Enrico Defranchi & al, 2005

Modèle	Echelle biologique	Détails	Technique	Module d'élasticité (kPa)	Autre propriété	Article
Souris WT (C57) et mdx  Age : 6 à 8 semaines	Sections de muscle TA	Cytochalasine D  Colle en cyanoacrylate pour coller les tranches de muscle.	AFM (PSIA XE120, Park system, Korea)  Pointe pyramidale avec un angle d'ouverture de 35°	WT : E = 4,2 ± 1,1 kPa  WT (+ cyto D) E = 1,3 ± 0,7 kPa  mdx : E = 1,4 ± 0,4 kPa  mdx (+ cyto D) E = 0,8 ± 0,3 kPa  mdx (9 weeks) E = 0,8 ± 0,4 kPa  mdx, control to AAV-dystrophin E = 1,2 ± 0,5 kPa		S.Puttini & al, 2009
Souris WT (C57) et mdx  Age : 8 à 10 semaines  C2C12	Sections de muscle d'EDL  Myotubes (Souris et C2C12)		AFM (Asylum)  Pointe pyramidale avec un angle d'ouverture de 35°	WT (C57, EDL) : 12 kPa  mdx (EDL) : 18 kPa  WT C2C12 myotubes : 9 kPa		S. Sen, Dennis E.Discher, 2011
Souris males WT C57 et mdx  8 à 10 semaines	Sections de muscle TA		AFM (Xe120, Park Systems, Korea).  Pointe pyramidale avec un angle d'ouverture de 36°.	WT explants : 4,7 kPa  Mdx explants : 1,7 kPa		Katarzyna Chwalenia & al, 2022

Modèle	Echelle biologique	Détails	Technique	Module d'élasticité (kPa)	Autre propriété	Article
Souris males C57 de 4 mois et 24 mois	Sections de muscle TA et Quadriceps Fibres isolées de muscle EDL		AFM (Bioscope, Digital Instruments, Santa Barbara, USA) Pointe MLCT	<p>Fibres fraîches EDL :</p> <p>* 4 mois : 0,4 ± 0,1 kPa * 24 mois : 1,9 ± 0,3 kPa</p> <p>Fibres après 6 jours en culture : Pas de différence.</p> <p>Explants TA :</p> <p>* 4 mois : 2,8 kPa * 24 mois : 7,8 kPa</p> <p>Explants Quadri :</p> <p>* 4 mois : 3 kPa * 24 mois : 7 kPa</p>		Grégory Lacraz & al, 2015.

Modèle	Echelle biologique	Détails	Technique	Module d'élasticité (kPa)	Autre propriété	Article
<p>Patients humains</p> <p>* 2 garçons sains de 16 ans et 11 ans. * 3 garçons patients DMD de 14 ans, 14 ans et 15 ans. * 2 femmes saines de 78 ans et 66 ans.</p>	<p>Sections de muscles.</p> <p>Muscle paravertébrale pour les garçons sains/DMD.</p> <p>Muscle gluteus maximus pour les femmes saines.</p>		<p>AFM XE-120 (Park Systems, Suwon, Korea).</p> <p>Pointe pyramidale d'angle d'ouverture de 35°.</p>	<p>Paravertébral muscle de patients DMD/Sains congelés à l'isopentane refroidit à l'azote :</p> <p>* sain (16 ans) : <math>14,8 \pm 3,6</math> kPa (n=20 fibres) * sain (11 ans) : <math>8,6 \pm 6,9</math> kPa (n=20 fibres) * DMD (14 ans) : <math>1,4 \pm 1,1</math> kPa (21 fibres) * DMD (14 ans) : <math>1,4 \pm 0,9</math> kPa (18 fibres) * DMD (15 ans) : <math>1,3 \pm 1,2</math> kPa (n=18 fibres)</p> <p>Muscle gluteus maximus de 2 femmes 78 ans et 66 ans :</p> <p>* muscles frais : <math>13,9 \pm 2,3</math> kPa (n=39 fibres) / <math>15,9 \pm 2,5</math> kPa (n=41 fibres) * congelé isopentane : <math>13,1 \pm 2,2</math> kPa (n=33 fibres) / <math>17,1 \pm 2,2</math> kPa (n=41 fibres)</p>		<p>Ruthger W van Zwieten &amp; al 2014</p>



Modèle	Echelle biologique	Détails	Technique	Module d'élasticité (kPa)	Autre propriété	Article
6 enfant sains (10 ans)  6 enfants DMD ambulants (9,9 ans)	Muscle vastus medialis (VM)		Magnetic resonance elastography (1.5T MRI machine General Electric HDxt machine)	Rigidité du muscle VM :  * Sain $E = 3.06 \pm 0.21$ kPa * DMD $E = 4.75 \pm 0.5$ kPa		S.F. Bensamoun & al, 2015
Souris femelles de 3 mois	Muscles de la pâte arrière.		Ultrasound elastography (Aixplorer MultiwaveTM System, Supersonic Imagine, Aix-en-Provence, France)  SLH 20-6 linear transducer probe	Muscle WT : $E = 44.4 \pm 13.4$ kPa		Malek Kammoun & al, 2019

Modèle	Echelle biologique	Détails	Technique	Module d'élasticité (kPa)	Autre propriété	Article
Humain male : 42 ans	Muscle TA, Gastrocnemius, Soleus :  Position relâchée  Position tendue à 30% (dorsiflexion)		UE : (Aixplorer; SuperSonic Imagine, Aix-en-Provence, France)	TA : * Relâché : E = $40 \pm 1$ kPa * Tendu (dorsiflexion) : E = $258 \pm 15$ kPa.  Gastrocnemius : * Relâché : E = $16.5 \pm 1$ kPa * Tendu : E = $225.4 \pm 41$ kPa  Soleus : * Relâché : E = $14.5 \pm 2$ kPa * Tendu : E = $55 \pm 5$ kPa		Minoru Shinohara & al, 2010
Humain control et DMD âgés de $10,4 \pm 0,9$ ans	Muscle TA : * Position neutre * Position de flexion plantaire $20^\circ$		Aixplorer ultrasound scanner (Aixplorer, version 7, Supersonic Imagine, 134 France)  Sonde linéaire (4–15 MHz)	Patients sains :  * Position neutre E = $7.2 \pm 2.2$ kPa * Position de flexion plantaire E = $11.5 \pm 1.9$ kPa  Patients DMD :  * Position neutre E = $8.2 \pm 1.8$ kPa * Position de flexion plantaire E = $21.3 \pm 14.9$ kPa		Lilian Lacourpaille & al, 2017

Modèle	Echelle biologique	Détails	Technique	Module d'élasticité (kPa)	Autre propriété	Article
Humain entre 3 et 5 ans Control et DMD	Muscles : TA MG (Medial gastrocnemius)		UE (Toshiba Aplio 500 ; Toshiba Medical, Japan)  Sonde linéaire avec un intervalle de fréquence entre 4 et 15 MHz.	TA : * Control :  E = 3.54 ± 3.99 kPa * DMD :  E = 11.64 ± 1.35 kPa  MG : * Control :  E = 12.18 ± 5.56 kPa * DMD :  E = 12.9 ± 3.45 kPa		Anna Pichiecchio & al, 2018
Humain (n=20 enfants de 2-12 ans) 12 filles / 8 garçons	Muscle gastrocnémus  Position : 20° plantar flexion; 10° plantar flexion; 0° plantar flexion; 10° dorsiflexion		UE (SuperSonic Imagine, Aix-en-Provence, France)  Sonde linéaire (SL15-4; SuperSonic Imagine)	Module de cisaillement :  Pied droit : E = 17,6 ± 6,6 kPa Pied gauche : E = 16,8 ± 6,9 kPa		Joline E. Brandenburg & al, 2015

Modèle	Echelle biologique	Détails	Technique	Module d'élasticité (kPa)	Autre propriété	Article
Humain 25 femmes (âge $19 \pm 2$ ans)  21 hommes (âge $19 \pm 1$ an)	Muscle TA		UE AixPlorer ultrasonic scanner (version 6.1.1, Supersonic Imagine, Aix en Provence, France)  Sonde linéaire (4–15 MHz, SuperLinear 15–4, Vermon, Tours, France).	20° de contraction musculaire volontaire : Hommes : $43.2 \pm 12.8$ kPa Femmes : $45.8 \pm 12.8$ kPa  60° de contraction musculaire volontaire : Hommes : $129.1 \pm 38.9$ kPa Femmes : $137.0 \pm 38.7$ kPa		Robin Souron & al, 2016
Humain Patient control : $9.2 \pm 4.06$ ans  Patients DMD : $7.81 \pm 1.94$ / $12.77 \pm 1.35$ ans / $17.35 \pm$ $1.33$ ans	Muscle TA		UE (Siemens ACUSON S2000 Ultrasound System, Virtual Touch Tissue)  Sonde linéaire (9L4 linear transducer, Siemens, Erlangen, Germany)	Vitesse de l'onde de cisaillement (m/s):  TA droit :  * Control : $2.75 \pm 0.31$ * Stage 01 : $2.83 \pm 0.42$ * Stage 02 : $2.27 \pm 0.56$ * Stage 03 : $2.12 \pm 0.54$  TA gauche :  * Control : $2.7 \pm 0.42$ * Stage 01 : $3.18 \pm 0.65$ * Stage 02 : $2.07 \pm 0.52$ * Stage 03 : $3.1 \pm 0.38$		Chia-WeiLin & al, 2021

#### 3.3.4. *Différents modèles existants et pertinence de notre modèle de RatDel52 :*

L'un des défis majeurs dans l'étude de la DMD réside dans le choix du modèle d'étude qui doit être le plus représentatif du phénotype observé chez l'humain. Or, la plupart des travaux précliniques précoces sont effectués sur des modèles qui présentent un phénotype pathologique ne récapitulant pas la majorité de la présentation clinique des patients DMD, comme le modèle mdx chez la souris (Chamberlain et al., 2007). Afin de se rapprocher du phénotype humain, des modèles animaux de grande taille ont été identifiés ou générés tels que des modèles de porc, de chien, de singe rhésus ainsi que des modèles alternatifs de rongeur tels que des modèles de rats (Kornegay, 2017; K. Nakamura et al., 2014; Selsby et al., 2015). Cependant, rares sont les modèles qui présentent des mutations au point chaud décrit précédemment au niveau des exons 45-55. On peut citer comme exemple un modèle canin avec une délétion à l'exon 50 (Amoasii et al., 2018) et un modèle de porc avec une délétion à l'exon 52 (Klymiuk et al., 2013). Cette rareté des modèles, en plus de la difficulté à les manipuler, la différence de séquence de ces modèles animaux et humains ainsi que les questions éthiques liées à leur utilisation limitent considérablement leur utilisation pour tester les traitements de thérapie génique basés sur des mutations comme des sauts d'exon. Pour répondre à cette problématique, un nouveau modèle de rat qui présente une mutation de délétion dans l'exon 52, appelé R-DMDdel52, a été développé spécifiquement au laboratoire (Taglietti et al., 2022). Pour ce faire, la technique de l'édition génétique CRISPR/Cas9 (Jinek et al., 2012) a été déployée pour supprimer l'exon 52 du gène DMD qui code pour la dystrophine (Figure 32.a). Cette suppression induit une mutation dans le gène DMD qui imite la sévérité du phénotype observé chez les patients DMD. En croisant les rats portant cette mutation, une colonie de rats R-DMDdel52 a ainsi pu être créée. Contrairement aux souris mdx, les rats R-DMDdel52 présentent une létalité prématurée (10 à 14 mois) (Figure 32.b) et un remodelage dystrophique sévère de leur musculature, y compris de leur cœur et de leur diaphragme. Plusieurs paramètres ont pu être caractérisés comme illustré sur la Figure 32.c. En effet, le marquage de la dystrophine et de son complexe associé, le dystroglycan, sur des coupes musculaires de rats WT et DMD de 3 mois et 12 mois, montre une absence avérée de ces deux protéines dès le 3<sup>ème</sup> mois. Ceci a été observé aussi en comparant le pourcentage de fibres positives à la dystrophine à 3 semaines, 3 mois, 6 mois et 12 mois (Figure 32.d). Ces résultats ont été confirmés par western blot effectué sur le soleus et le diaphragme (Figure 32.e). En complément, le niveau de créatine kinase qui est fortement élevé à 3 mois, décroît en fonction de l'âge dû au remplacement du tissu musculaire par un tissu fibrotique et graisseux (Figure 32.f). Cette perte musculaire progressive a été observée à partir

du 2<sup>ème</sup> mois (Figure 32.g). Ceci a été confirmé par la longueur inchangée des muscles Tibialis Anterior à 12 mois, ce qui prouve que la perte musculaire n'est pas due à un défaut de croissance mais plutôt à une atrophie musculaire accrue (Figure 32.h). En parallèle de cette caractérisation, des tests fonctionnels de mesure de force, des tests des fonctions cardio-respiratoires ainsi qu'une quantification de la présence de graisse et d'inflammation (Figure 32.i.j.k.l.m) ont été réalisées et montrent une claire détérioration des muscles squelettiques et cardiaques. L'ensemble de ces résultats démontrent l'existence d'un phénotype prononcé et progressif du modèle de rat développé par le laboratoire qui reflètent donc la pertinence de ce modèle comme outil préclinique (Taglietti et al., 2022).

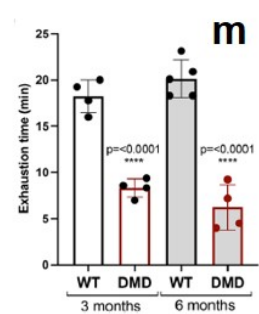
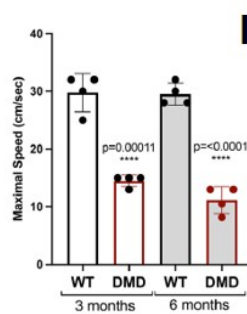
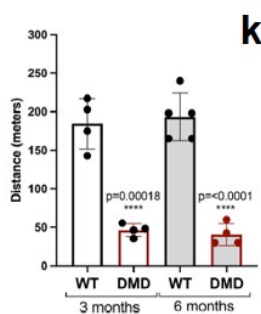
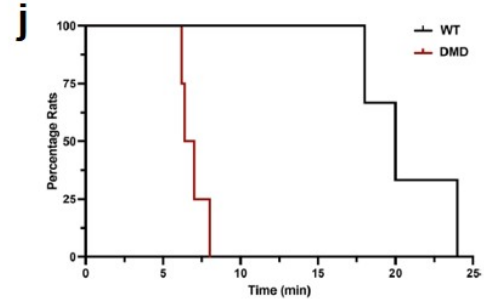
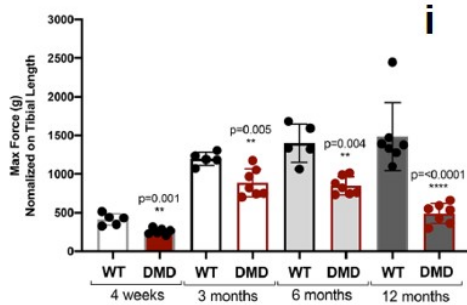
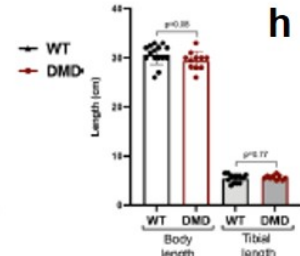
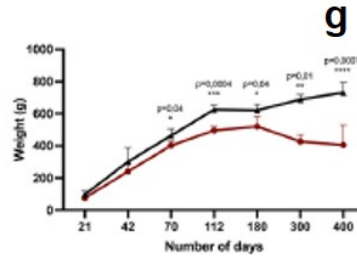
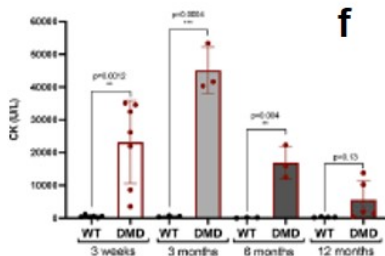
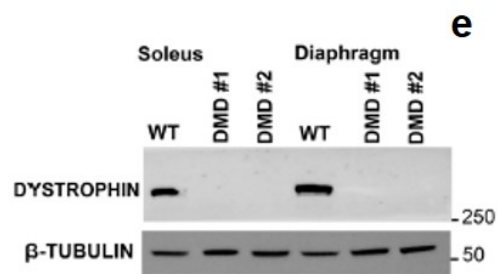
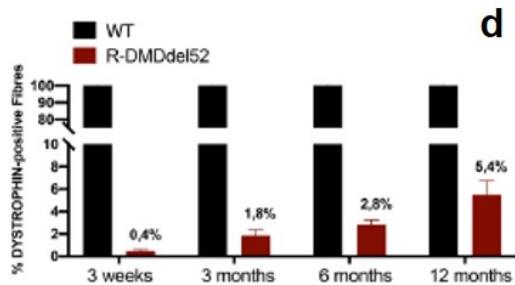
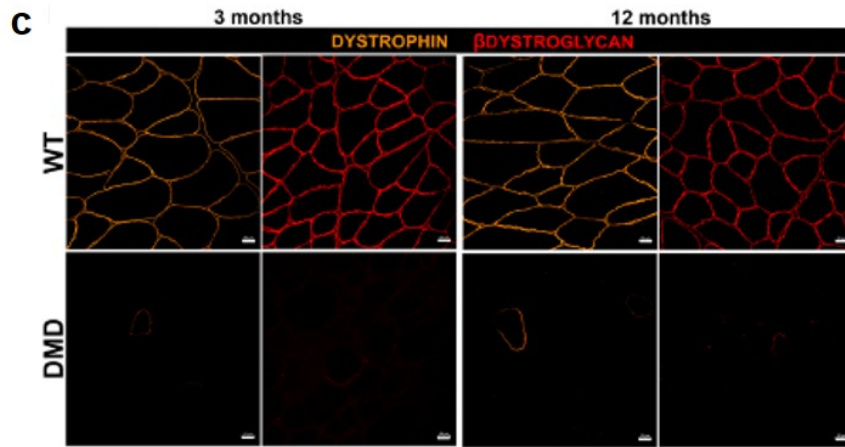
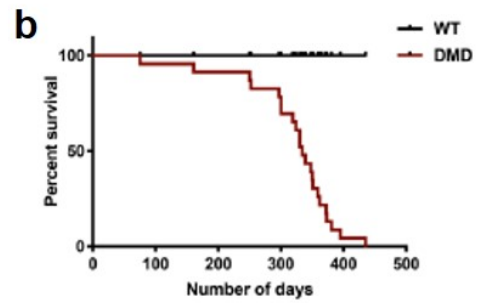
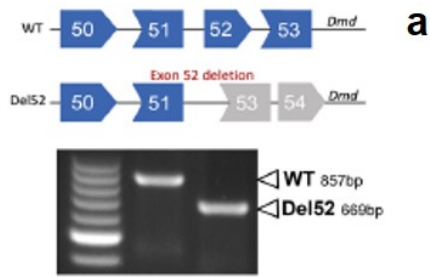


Figure 32 : Décès prématuré, absence d'expression de la dystrophine, atrophie musculaire et atteinte fonctionnelle chez les rats R-DMDdel52. a. Schéma de la délétion génétique induite par CRISPR chez les rats et données de géotypage des animaux WT et R-DMDdel52. La position des bandes WT et délétion (del52) est indiquée. b. Courbe de Kaplan Meier pour la fréquence de survie des rats WT (courbe noire) et R-DMDdel52 (courbe rouge). c. Immunofluorescence de la Dystrophin (orange) et la  $\beta$ Dystroglycan (rouge) sur des sections de muscle tibialis anterior (TA) chez les rats WT et R-DMDdel52 âgés de 3 mois (panneaux de gauche) et de 12 mois (panneaux de droite). Échelle de 20  $\mu$ m. d. Quantification du pourcentage de fibres positives à la dystrophine dans le TA de rats WT et le R-DMDdel52 à 3 semaines, 3, 6, 12 mois. e. Analyse par Western blot des protéines WT et R-DMDdel52 extraites des tissus du muscle soleus et diaphragme. La quantité de protéines chargées a été normalisée aux niveaux de  $\beta$ -TUBULINE. f. Taux de CK des rats WT et R-DMDdel52 âgés de 3 semaines, 3 mois, 6 mois et 12 mois. g. Courbe de poids montrant que les rats R-DMDdel52 ont affiché une perte de poids progressive par rapport aux rats sains (WT). h. Graphique montrant la longueur du corps et du tibia des rats R-DMDdel52 et WT en centimètres. i. Force maximale appliquée pendant l'essai de serrage à l'âge de 3 semaines, 3, 6 et 12 mois chez les rats WT et R-DMDdel52. j. Graphique montrant le pourcentage de rats épuisés à un temps t pendant les essais sur tapis roulant, effectué sur des animaux WT et R-DMDdel52 âgés de 6 mois. k. distance maximale en mètres. l. vitesse maximale exprimée en cm/s. m. et temps d'épuisement en minutes. Le tout mesuré au cours de l'essai sur tapis roulant effectué sur des rats R-DMDdel52 et WT âgés de 3 et 6 mois. Adapté de (Taglietti et al., 2022)

## 4. Problématique :

Dans cette introduction, nous avons mis en évidence l'existence d'un lien entre l'organisation du cytosquelette d'une cellule, ses propriétés mécaniques et celles des tissus résultants ainsi que leur phénotype. Nous avons également montré que le tissu musculaire a une structure complexe à plusieurs échelles et que la dystrophine est un élément clé du cytosquelette des cellules le composant. D'ailleurs, en l'absence de dystrophine, une maladie grave et progressive qui affecte tous les muscles squelettiques, connue sous le nom de dystrophie musculaire de Duchenne, se développe. Enfin, nous avons généré un modèle de rat pertinent pour l'étude de cette maladie dans notre laboratoire, appelé R-DMDdel52.

Nos questions scientifiques sont donc : Quel est l'impact de l'absence de la dystrophine sur les propriétés mécaniques du muscle et quelle est la pertinence de mesurer ces propriétés dans le contexte de cette maladie, à quelle échelle cette réponse mécanique apparaît-elle et finalement, la maladie étant progressive, à quelle étape de la maladie cette réponse est-elle la plus prononcée ?

## 5. Structure de l'étude :

Afin de répondre à ces questions, nous avons effectué une caractérisation des propriétés mécaniques telles que le module de Young et la viscosité à différentes échelles, plus précisément à l'échelle du myoblaste, du myotube, de la fibre musculaire isolée et du muscle entier. Nous avons également caractérisé deux fonctions biologiques importantes des



myoblastes, à savoir la prolifération et la migration, par vidéo microscopie, ainsi que la structure par imagerie confocale et par la quantification d'expression de gènes.

Pour ce faire, nos travaux ont été réalisées sur le modèle de rat R-DMDdel52 pour sa pertinence. Cette caractérisation du modèle dystrophique a été comparée à une caractérisation réalisée sur les contrôles WT issus de la même lignée. La DMD étant une maladie progressive, nous avons réalisé cette caractérisation à 3 temps différents, 1 mois, 6 mois et 10 mois, ce qui équivaut à l'âge de 10 ans, 18 ans et 26 ans respectivement pour l'humain (Figure 33.A) (P. Sengupta, 2013). De ce fait, 1 mois est l'âge de début d'apparition des symptômes, 6 mois est l'âge où ces symptômes s'accroissent et 10 mois est l'âge à partir duquel le rat DMD risque de décéder. Pour résumer la caractérisation proposée dans ce travail, un schéma de l'étude est proposé sur la Figure 33.B.

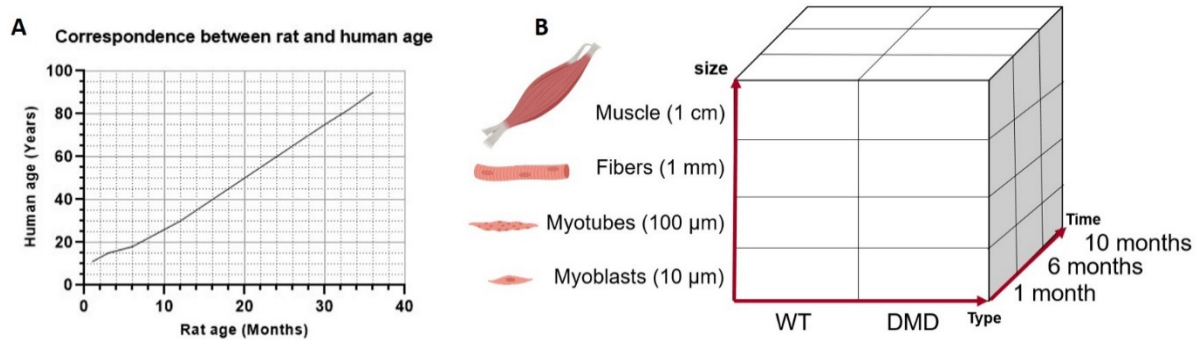


Figure 33 : A. Courbe de correspondance entre l'âge du rat et l'âge de l'humain. B. Représentation de l'approche mécanique sur 3 dimensions de l'étude.

## Matériels et méthodes

## 1. Mise en œuvre des expériences :

Pour caractériser et comparer les propriétés mécaniques, topographiques et structurales au niveau du myoblaste, du myotube, de la fibre musculaire en condition *in vitro* et du muscle en condition *in vivo*, différentes méthodes et techniques ont été mises au point et adaptées à notre étude. Cette dernière a été réalisée sur des rats WT et DMD (modèle R-DMDdel52) mâles, élevés au Centre de Distribution, de Typage et d'Archivage animal d'Orléans (CDTA), puis acheminés à l'animalerie de l'IMRB à l'âge de 3 semaines. Dès lors, ils ont été élevés en cage dans des conditions standards à température contrôlée ( $22 \pm 2$  °C) et soumis à un cycle lumière/obscurité de 12h. La démarche expérimentale suivie au cours de ce travail se présente sous la forme d'une succession d'étapes illustrée sur la Figure 34.

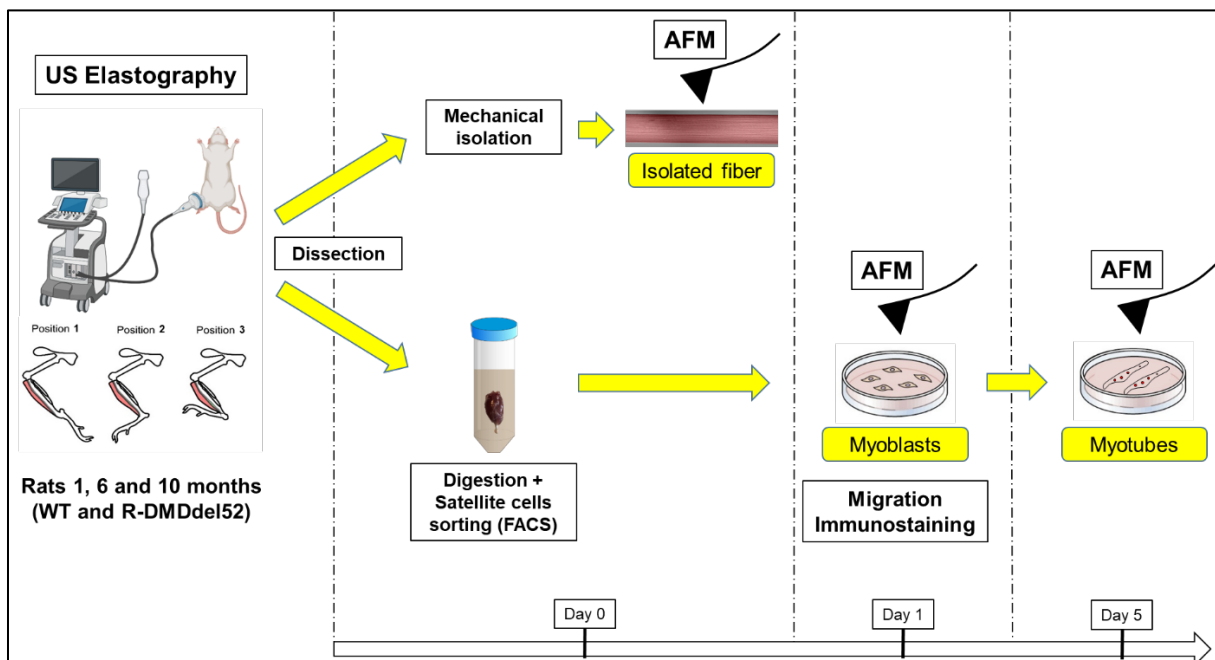


Figure 34 : Schéma illustrant notre démarche expérimentale.

Brièvement, au jour 0 (J0), la première étape consiste à réaliser des mesures d'élastographie sur les pattes postérieures du rat préalablement anesthésié. A la fin de cette série de mesures, le rat est sacrifié puis disséqué. D'une part, les muscles EDL sont extraits pour isoler les fibres musculaires qui sont caractérisées le jour même par AFM. D'autre part, les muscles TA et quadriceps sont extraits pour isoler les cellules satellites. Ces cellules sont alors mises en culture pour proliférer et se différencier en myotube. Les mesures par AFM sont réalisées sur les myoblastes et les myotubes respectivement à J1 et J5. Par ailleurs, les cellules sont également fixées et marquées à J1 et J5 et des vidéos de myoblastes en culture sont enregistrées pendant 18h afin d'étudier leur migration.

Ce chapitre présente donc les modèles biologiques comprenant le protocole de préparation des rats pour les mesures *in vivo*, le protocole d'extraction des fibres musculaires, le protocole de culture cellulaire, ainsi que les mesures expérimentales incluant les mesures AFM, l'élastographie, la vidéo-microscopie et la microscopie confocale, avec leurs méthodes d'analyse des données associées.

## 2. Modèles biologiques :

### 2.1. Préparation du rat pour l'élastographie :

Pour réaliser les mesures par élastographie, le rat WT ou DMD est préalablement anesthésié. Pour ce faire, il est placé dans une boîte d'anesthésie à l'isoflurane (Figure 35.a). L'isoflurane est mélangé à de l'air contenant 92% d'oxygène grâce à un compresseur et un mélangeur. Le pourcentage d'isoflurane utilisé dépend de l'âge du rat et est de 1,5%, 2% et 2,4% pour des rats âgés de 1 mois, 6 mois et 10 mois respectivement. Une fois endormi, le rat est déposé sur un tapis chauffant avec un masque placé sur son museau permettant d'appliquer un flux d'anesthésiant constant pendant les mesures d'élastographie (Figure 35.b). Le maintien du rat endormi, tout au long de l'expérience, nous permet d'éviter tout mouvement du rat et d'assurer une reproductibilité des mesures. Par ailleurs, étant donné que cette technique nécessite l'utilisation d'un gel comme intermédiaire entre la sonde et la peau, les poils des deux pattes postérieures du rat sont enlevés à l'aide d'une tondeuse et d'une crème dépilatoire (Figure 35.b).

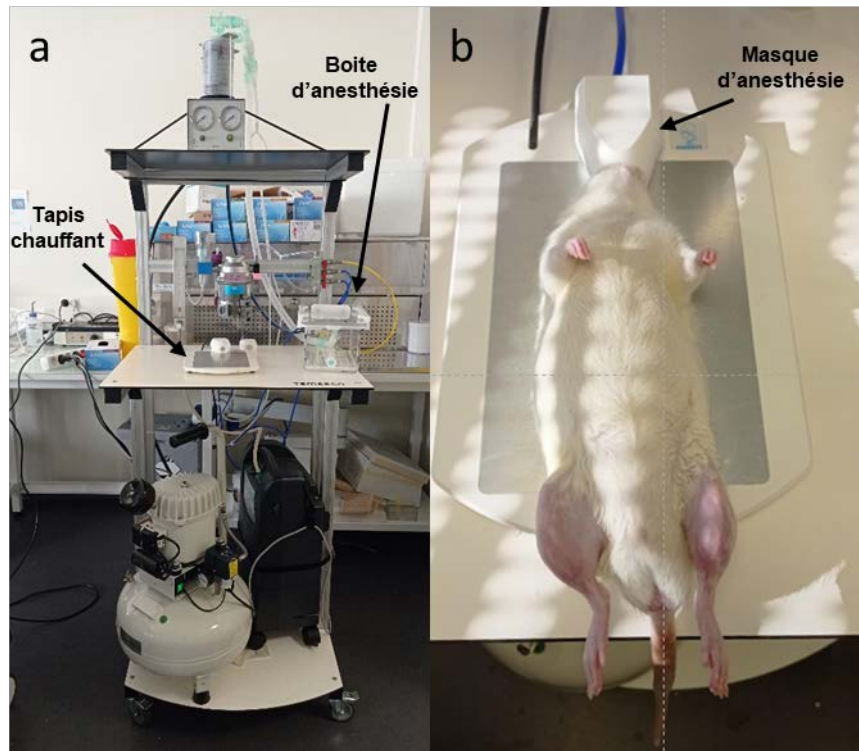


Figure 35 : Photo illustrant le banc à isoflurane (a) et un rat épilé anesthésié et déposé sur un tapis chauffant (b).

Les mesures d'élastographie ont été réalisées pour 3 positions différentes de la patte. Ces 3 positions ont été choisies pour représenter 3 états différents d'un muscle : allongé, au repos ou contracté (Figure 36). Plus précisément, la position 1 correspond à une position de flexion plantaire dans laquelle le muscle TA est allongé (Figure 36, Figure 37.a), la position 2 correspond à une position neutre ou d'équilibre (muscle au repos) et la position 3 correspond à une position de dorsiflexion, ou de flexion dorsale, dans laquelle le muscle TA est complètement contracté (Figure 36, Figure 37.b) (Fujita et al., 2009).

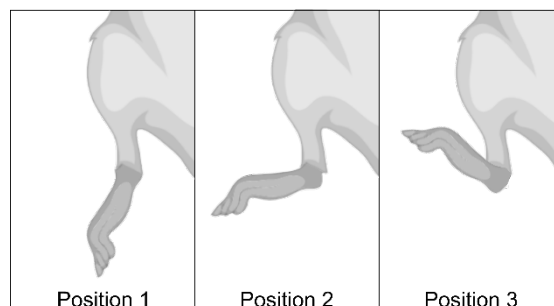


Figure 36 : Schéma présentant les 3 positions qui ont été utilisées pour effectuer les mesures en élastographie.

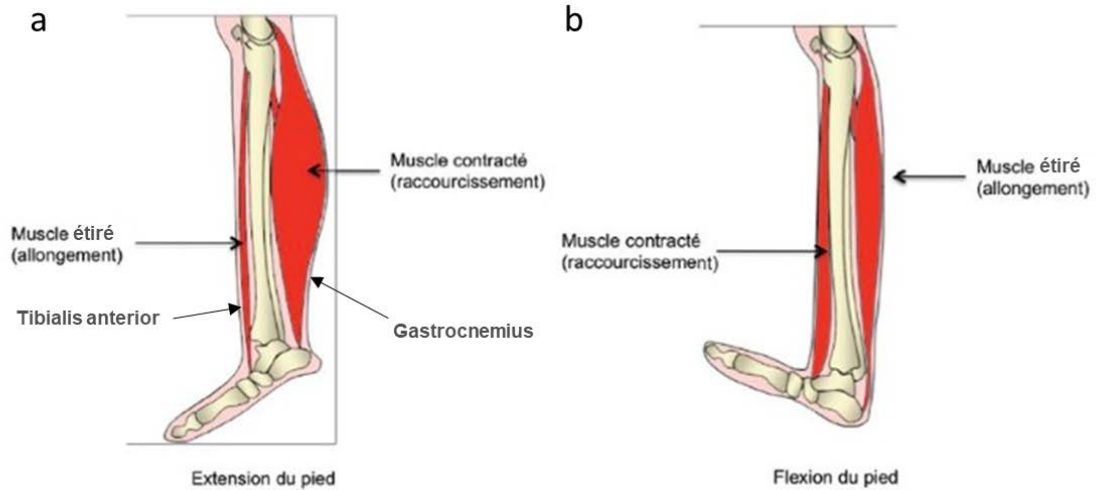


Figure 37 : Dessin illustrant l'état des muscles Tibialis Anterior (TA) et Gastrocnemius (G) lors de l'extension (a) et la flexion plantaire (b) du pied.

## 2.2. Préparation de la fibre musculaire pour l'AFM :

Après les mesures par élastographie, le rat retourne à l'animalerie, est placé dans une boîte à CO<sub>2</sub>, puis est euthanasié par inhalation de CO<sub>2</sub> pendant 12 minutes. En salle de dissection, les muscles EDL des deux pattes postérieures sont prélevés de tendon à tendon pour isoler les fibres. Notons que les muscles TA et quadriceps sont également extraits à cette étape de la dissection pour isoler les cellules satellites dont le protocole est décrit dans la partie Tri cellulaire ci-dessous.

L'isolation des fibres musculaires se fait dans un intervalle de temps pouvant aller jusqu'à 3 heures après la dissection. Elle est effectuée mécaniquement à l'aide de pinces Dumont Mini Forceps - Style 5 et d'un microscope binoculaire Zeiss avec un grossissement x2. Une fois que la fibre musculaire est isolée, elle est collée sur une lamelle de verre à ses deux extrémités par une goutte de colle. L'ensemble est immergé dans du PBS (Figure 38).

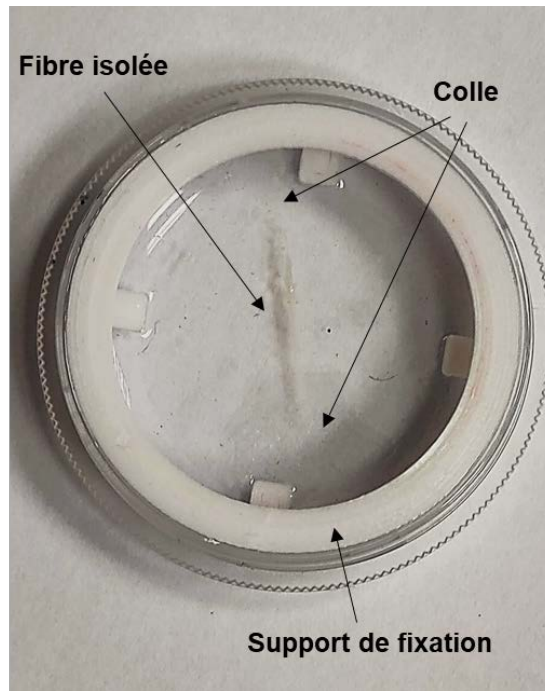


Figure 38 : Photo montrant une fibre musculaire collée à ses deux extrémités sur une lamelle en verre placée dans une boîte Ibidi et maintenue avec un support de fixation imprimé en 3D.

### 2.3. Culture cellulaire :

Au cours de la dissection du rat décrite au paragraphe précédent, les muscles TA et quadriceps sont également extraits. Ils sont ensuite hachés à l'aide de ciseaux et pesés avant de les mettre à digérer dans un milieu contenant deux types d'enzymes, la dispase et la collagénase. Concrètement, nous utilisons 0,08g de dispase et 0,05g de collagénase diluées dans 25ml d'HBSS pour 2g de muscles hachés. Le mélange, muscle-milieu de digestion, est ensuite incubé sous agitation à 37°C pendant 1h. Les muscles digérés sont ensuite dissociés mécaniquement grâce à une pipette de 10ml qui permet de réaliser des mouvements d'aspiration et de refoulement. Les enzymes sont ensuite séparés du mélange par centrifugation. Afin d'éliminer les résidus de matière issus de la digestion musculaire et dont la taille est supérieure à 100µm, le mélange est dilué plusieurs fois et est filtré. Le muscle digéré ainsi obtenu contient différents types cellulaires tels que des cellules satellites, des fibroblastes, des macrophages, etc. Rappelons que nos cellules d'intérêt sont les myoblastes qui dérivent des cellules souches du muscle à savoir les cellules satellites. Bien que les myoblastes aient une morphologie en culture assez spécifique en forme « d'œil de pharaon », ce paramètre n'est pas suffisant pour les identifier en culture de façon certaine. Or dans ce travail, les mesures sont réalisées sur cellules uniques. Ainsi, nous avons testé différentes techniques de tri cellulaire pour isoler spécifiquement les cellules satellites du muscle digéré. Notons que les techniques de

reconnaissance de type cellulaire basé sur l'identification d'un marqueur ne peuvent pas être utilisées sur les cellules satellites/myoblastes vivants car aucun marqueur n'est disponible.

### 2.3.1. *Tri cellulaire :*

Nous avons testé trois stratégies de tri différentes telles que le « preplating », la centrifugation par gradient de densité de Percoll, et la cytométrie en flux (FACS pour Fluorescent-Activated Cells Cytometry). Le choix de la technique de tri la plus adaptée pour notre étude s'appuie sur plusieurs critères : le nombre de cellules obtenues à la fin du tri, la pureté de la culture obtenue et le coût de la technique utilisée.

#### a. Technique de tri basé sur le « Preplating » :

La technique de « preplating » repose sur le concept de l'adhérence différentielle entre les différents types cellulaires. Concrètement, elle consiste à ensemercer le mélange de muscle digéré dans une première boîte de Pétri en culture. Après un certain laps de temps allant de 30 min à 3h de sédimentation des cellules, le surnageant est transféré dans une seconde boîte de Pétri. Les cellules satellites étant moins lourdes et avec un faible potentiel d'adhérence que les autres types cellulaires, elles devraient adhérer moins rapidement sur la boîte de Pétri que les autres cellules. En transférant le surnageant dans une autre boîte, celui-ci devrait contenir principalement des myoblastes (Figure 39.a). Dans notre étude, nous avons choisi des temps de sédimentation de 1h (1h complète ou 3 x 20 min en changeant de boîte entre chaque intervalle de temps), 2h (sous la forme de 2 x 1h), 1h30 et 3h. Les cellules sont laissées ensuite en culture pour proliférer. Après 24h, elles sont fixées au paraformaldéhyde à 4%, et marquées à l'aide de marqueurs fluorescents spécifiques des myoblastes tels que PAX7 et MYOD. Les noyaux cellulaires sont également marqués au DAPI. Les myoblastes seront ainsi identifiés par immuno-marquage. Des acquisitions d'images de la culture cellulaire sont réalisées au microscope Axio (Figure 39.b). Pour déterminer la pureté de la culture cellulaire obtenue, nous comptons le nombre de cellules marquées Pax7+ / MyoD+ que nous rapportons au nombre total de cellules (évalué par marquage nucléaire au DAPI).



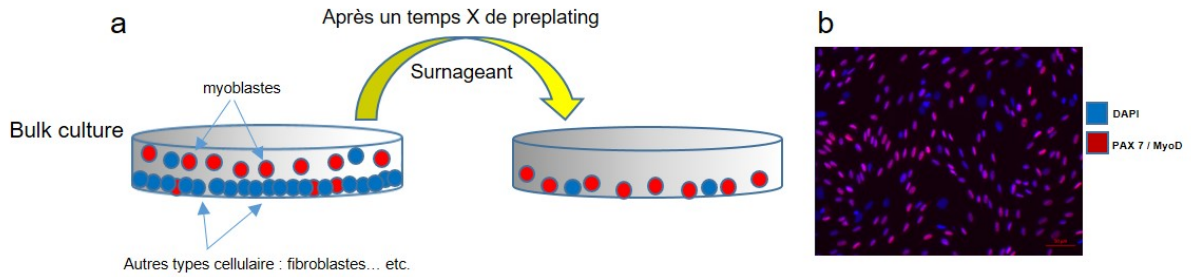


Figure 39 : a. Schéma du principe du « preplating ». b. Image prise au microscope Axio de cellules issues du tri par « preplating » marquées au DAPI (en bleu) et à l'anticorps anti-PAX7 et -MOYD (en rouge) après 24h de culture, échelle 50µm.

Les résultats présentés sur la Figure 40 montrent que les pourcentages de pureté de la population cellulaire triée par « preplating » varient entre 39% et 77%. Ces taux sont jugés trop faibles au regard de nos conditions expérimentales qui imposent de travailler sur cellule unique.

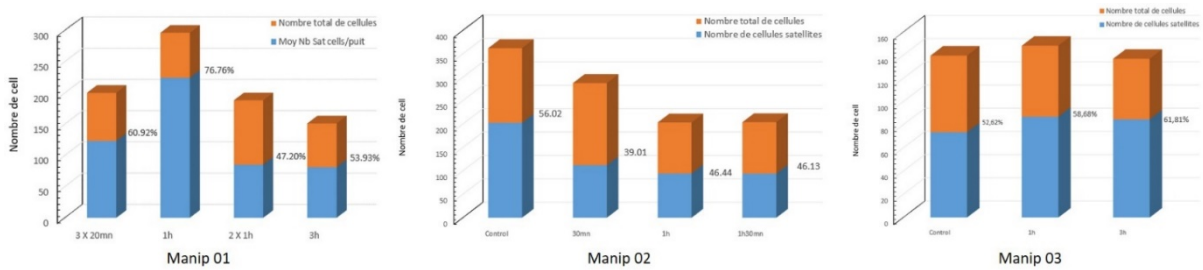


Figure 40 : Histogrammes représentant des résultats de preplating sur 3 expériences différentes montrant les pourcentages de cellules satellites sur le nombre total de cellules.

Nous avons tenté d'améliorer le protocole de « preplating » en s'inspirant de celui utilisé par nos collègues de l'école vétérinaire qui utilisent un milieu de culture appelé MYO1 pour trier des cellules satellites de chien. Les résultats de ces essais sont illustrés sur la Figure 41.

Il apparaît que la présence de ce milieu de culture MOY1 n'améliore pas la qualité de la culture obtenue. Nous avons finalement abandonné cette technique de tri au profit de la technique par centrifugation par gradient de Percoll.

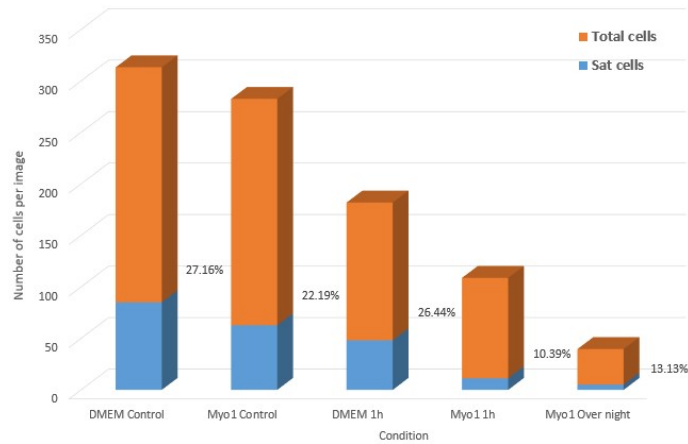


Figure 41 : Histogramme représentant les résultats d'une expérience de « preplating » avec utilisation soit du milieu DMEM soit du milieu MYO1. Le nombre total de cellules comptées est représenté en orange tandis que le nombre total de cellules satellites comptées est indiqué en bleu.

b. Centrifugation par gradient de densité de Percoll :

Cette technique de tri consiste à séparer des populations de cellules présentes dans une solution par ultracentrifugation en gradient de densité. Concrètement, il s'agit de superposer des couches de solution de Percoll (milieu composé de silice colloïdale) à différentes densités dans un tube (Matsuyoshi et al., 2019). Dans notre cas, 4 densités ont été préparées, respectivement à 27.5%, 35%, 40%, 55%, and 90% de Percoll dans du  $\alpha$ -MEM. Le mélange de muscle digéré est ajouté par-dessus les couches de Percoll. Puis, le tube est centrifugé à une vitesse de 3200 rpm pendant 20 minutes. Les cellules se répartissent dans la colonne de Percoll en fonction de leur densité. Ainsi, 3 fractions différentes de cellules sont identifiées, et appelées F1, F2 et F3 comme illustré sur la Figure 42. Nos cellules d'intérêt se situent dans la fraction F3. Elles sont prélevées de la F3 (2ml) puis sont mises en culture.

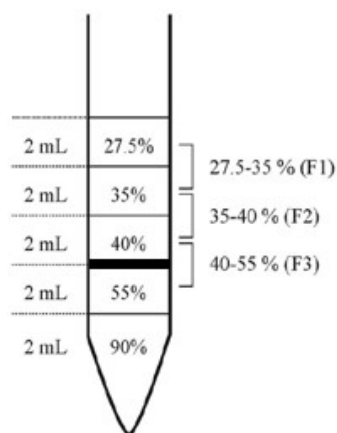


Figure 42 : Schéma de la colonne de percoll avec les différentes densités utilisées et l'emplacement supposé des cellules satellites après centrifugation (en gras) (Matsuyoshi et al., 2019).

Les résultats de la culture sont illustrés sur la Figure 43.

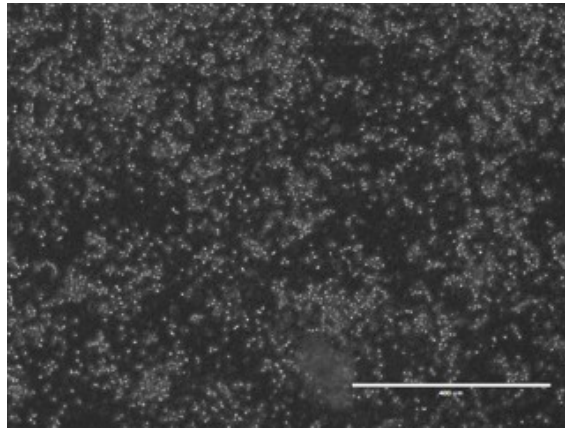


Figure 43 : Image prise en contraste de phase de cellules mortes après un tri par centrifugation par gradient de densité de Percoll. Echelle 400  $\mu\text{m}$ .

Le taux de mortalité des cellules étant très élevé, nous avons testé différentes densités de Percoll, et vitesses de centrifugation. Cependant aucune amélioration du taux de mortalité cellulaire a été constaté (résultats non présentés).

Nous avons également tenté de coupler ces deux techniques pour améliorer le rendement, cependant les résultats sur la pureté de la culture cellulaire n'étaient toujours pas satisfaisants (résultats non présentés). Nous avons alors testé la technique de cytométrie en flux (FACS). Cette technique n'a pas été notre premier choix car elle est coûteuse et le nombre de cellules triées en sortie du FACS est faible comparé aux techniques précédentes.

c. Tri cellulaire par cytométrie en flux (FACS) :

Cette technique a été inventée par Len Herzenberg dans les années 1970 (Julius, Masuda et al. 1972), puis a été reprise par BD Biosciences-Immunocytometry Systems, une division de Becton-Dickinson (Perkel 2004). Elle consiste à caractériser les cellules, en suspension dans un liquide, individuellement, quantitativement et qualitativement. Les cellules, préalablement marquées par différents anticorps couplés à des fluorochromes défilent à grande vitesse dans un faisceau laser. Après interaction avec les cellules, la lumière du cytomètre est émise soit par des phénomènes de diffusion soit par des phénomènes de fluorescence, ce qui permet de classer les cellules par population et de les compter suivant plusieurs critères. Les phénomènes de diffusion lumineuse permettent de caractériser les paramètres morphologiques de la cellule notamment sa taille et sa granulosité, tandis que les phénomènes de fluorescence permettent d'identifier le type cellulaire, leur état de différenciation ou leur stade de développement par la présence de marqueur spécifique. Une fois que les cellules ont été caractérisées en fonction de

ces différents paramètres, elles sont triées à l'aide d'un champ électrique qui génère des charges électriques positives et négatives sur les cellules (Figure 44). Les cellules sont alors dirigées vers des collecteurs qui les recueillent pour une utilisation ultérieure ou bien déposés dans un collecteur poubelle (Hodne et al., 2015).

Ce procédé d'analyse individuelle multiparamétrique, s'effectue à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. Un logiciel d'analyse de données associé à cette technique permet de calculer les statistiques relatives aux distributions des paramètres mesurés. Les résultats sont présentés sous la forme de cytogrammes (deux paramètres) sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées.

Cette technique est largement utilisée en biologie cellulaire et moléculaire pour la caractérisation et la purification de cellules spécifiques dans un échantillon (Carter et al., 2013).

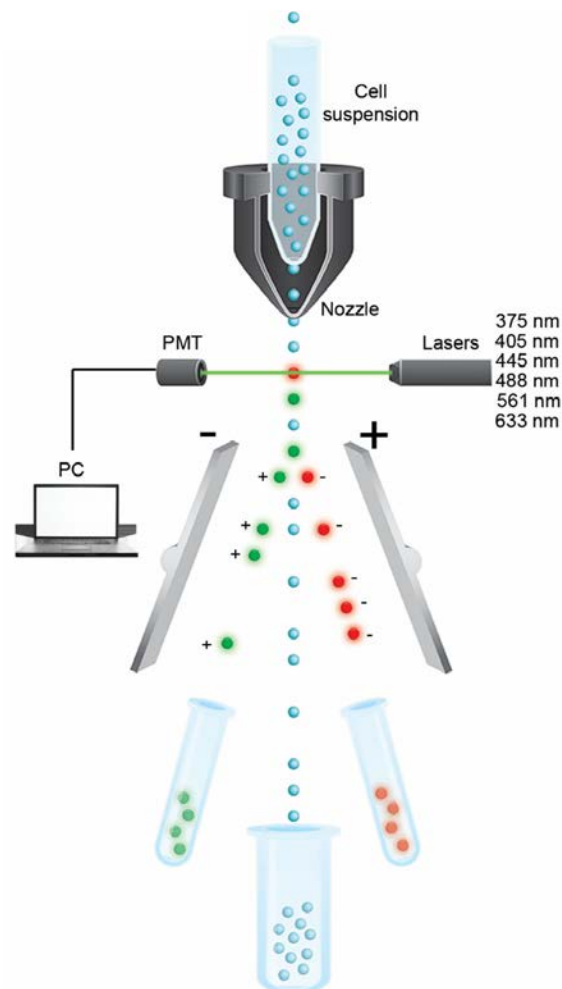


Figure 44 : Schéma du principe du FACS (Hodne & Weltzien, 2015)

Pour isoler les cellules satellites du mélange de muscle digéré (par exemple pour 4g de muscles), nous incubons le mélange avec différents anticorps tels que l'anticorps CD45-PE

(PhycoErythrin)–Cy7 (2.5 µl, BDPharmingen, 552848), l'anticorps CD29–APC (2.5 µl, Biolegend, 102215), l'anticorps Ter119–PE–Cy7 (2.5 µl, BDPharmingen, 557853), l'anticorps CD31–PE–Cy7 (2.5 µl, BDPharmingen, 561410), l'anticorps  $\alpha$ 7-integrin-FITC (3 µl, CliniSciences, C179570-100), et l'anticorps CD106-PE (5 µl, BDPharmingen, 559229). L'ensemble de ces anticorps est dilué préalablement dans une solution contenant de la désoxyribonucléase (DNase, diluée au 1/100, Sigma-Aldrich, DN25) et 5% d'albumine de sérum de bovin (BSA).

Nous laissons incuber le mélange de muscle dans cette solution pendant 35 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Ensuite, le mélange est centrifugé, dilué et filtré (40µm). A la fin, le mélange de muscle digéré est repris dans de l'HBSS supplémenté avec 20% de Sérum de Veau Fœtal (SVF, GIBCO). A cette solution, le marqueur nucléaire (7AAD, dilué au 1/100), est ajouté à la solution finale. Ce marqueur permet de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes lorsqu'elles passent au FACS. La solution est alors diluée et filtrée une dernière fois avant d'être placée dans le FACS. Une buse de 85 µm est utilisée pour notre tri. Notons que pour éviter la mort cellulaire, toutes les étapes allant du sacrifice de l'animal jusqu'au FACS doivent être réalisées le plus rapidement possible. En sortie, la technique du FACS donne une évaluation statistique du nombre de cellules satellites triées rapporté au nombre de cellules total.

La population des cellules satellites a été identifiée suivant ces critères : CD45-/Ter119-/CD31-/ $\alpha$ 7+ (Taglietti et al., 2023).

En général, on estime que le nombre de cellules satellites représente environ 2 à 7% de toutes les cellules nucléées dans le muscle adulte (Rudnicki et al., 2008). Les moyennes des pourcentages des cellules satellites obtenues pour l'ensemble des conditions étudiées (rat WT vs rat DMD âgés d'1 mois, 6 mois et 10 mois) sont présentées sur la Figure 45. Les résultats montrent une baisse du pourcentage de cellules satellites isolées en fonction de l'âge. Ceci est cohérent avec le changement d'état des cellules satellites en fonction de l'âge de l'animal (Taglietti et al., 2023). En effet, à 1 mois, les muscles des rats sont encore dans leur période de croissance périnatale qui est caractérisée par une activation accrue des cellules satellites. Elles sont donc nombreuses. Pour les rats de 6 mois et 10 mois, les muscles n'étant plus en période de croissance, les cellules satellites sont alors dans un état de quiescence, de ce fait elles sont moins nombreuses.

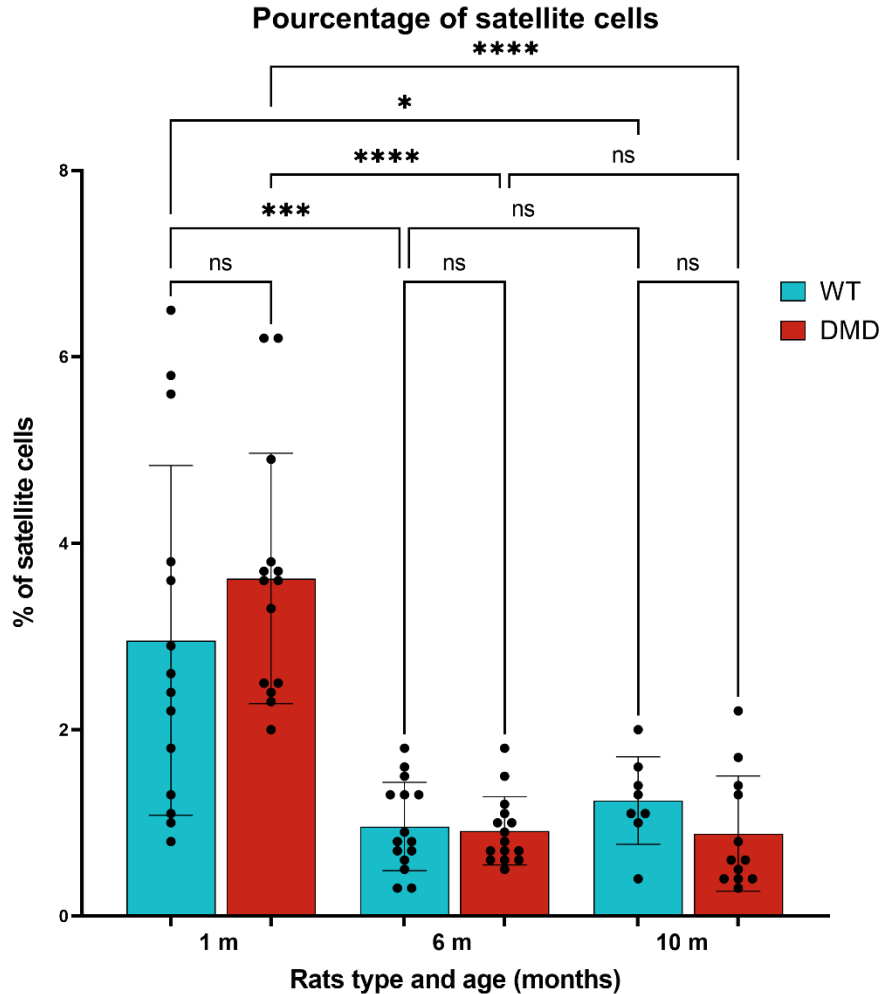


Figure 45 : Histogramme des pourcentages de cellules satellites obtenus par FACS sur l'ensemble des rats WT (bleu) et DMD (rose) à 1 mois, 6 mois et 10 mois.

### 2.3.2. Mise en culture :

En sortie du FACS, les cellules d'intérêt sont recueillies dans un tube Eppendorf de 2ml préalablement fonctionnalisé avec du SVF pendant 30 min à 37°C, afin d'amortir la chute des cellules dans le tube pendant le tri. Ces cellules sontensemencées à une densité de 16000 cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu de prolifération DMEM F12 (GIBCO, 11320033) supplémenté avec 20% SVF, 1% de Pénicilline Streptomycine (PS), 1% de glutamine, et du basic FGF dilué au 1/400 (25ng/ml, Sigma, SRP4037). Notons que le basic FGF, appelé aussi FGF2, est un facteur de croissance qui stimule la prolifération des cellules myogéniques (Yablonka-Reuveni et al., 1997), y compris après une blessure du muscle (Dimario et al., 1989). Deux types de support ont été utilisés pour la prolifération et la différenciation des cellules satellites en myoblastes : des boîtes 8 puits en plastique de la marque Sarstedt pour l'étude de la migration des myoblastes ainsi que pour les marquages, et des boîtes IbidiTreat en plastique pour les

mesures AFM. Pour diminuer la surface d'ensemencement à 1 cm<sup>2</sup> une couronne (ring) a été placée préalablement sur le fond de la boîte IbidiTreat comme illustré sur la Figure 46.

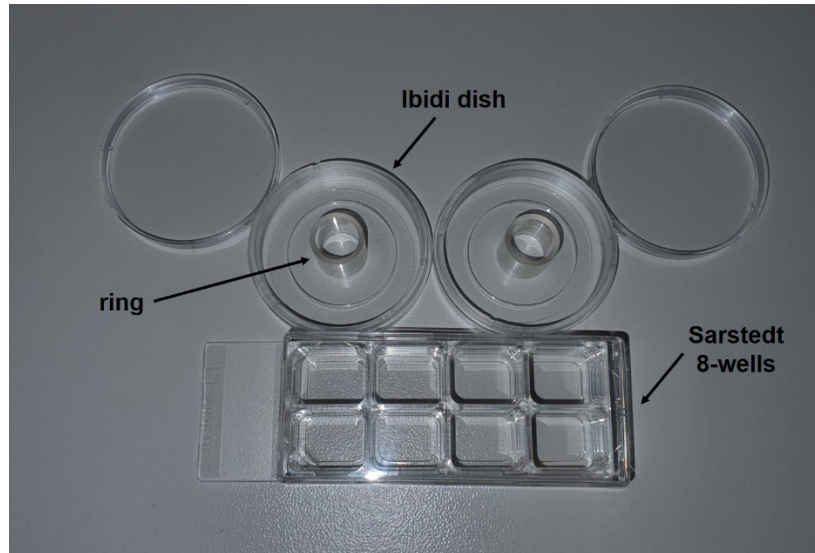


Figure 46 : Photo montrant les différentes boîtes de cultures utilisées.

Tous les supports utilisés pour l'ensemencement de nos cellules ont été recouverts de matrigel et incubés pendant 30 min à 37°C préalablement à la mise en culture. Pour la prolifération et la différenciation, les cellules triées sont maintenues dans un incubateur à 37 °C et 5% de CO<sub>2</sub>. L'analyse de la pureté dont les résultats sont présentés sur la Figure 47, montre que les pourcentages de cellules satellites dépassent les 95% pour les rats WT et DMD :

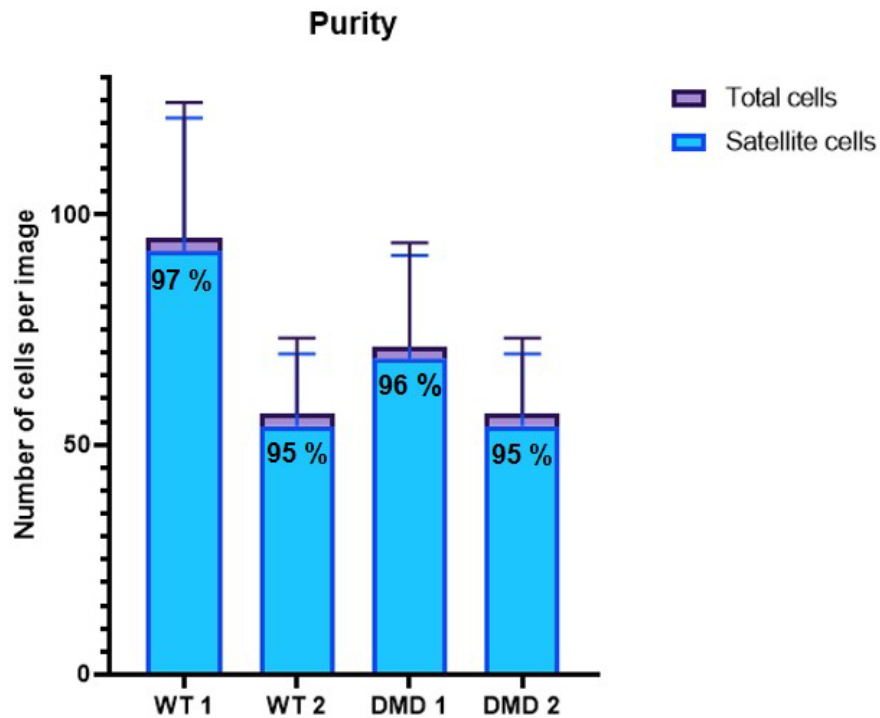


Figure 47 : Histogramme présentant la pureté des cultures de cellules satellites issues de 2 rats WT et de 2 rats DMD, triée par FACS et mise en culture pendant 24h. La pureté a été calculée à partir d'images d'immunomarquage prises à l'aide du microscope Axio.

Bien que le coût de cette technique ne soit pas négligeable, la technique de tri cellulaire par FACS est la seule à donner des pourcentages de pureté cellulaire très satisfaisant. De ce fait, le choix de la technique de tri s'est porté sur le FACS pour la réalisation de cette présente étude. Les images ci-dessous (Figure 48) montrent la morphologie des myoblastes issues du tri par FACS des cellules satellites.

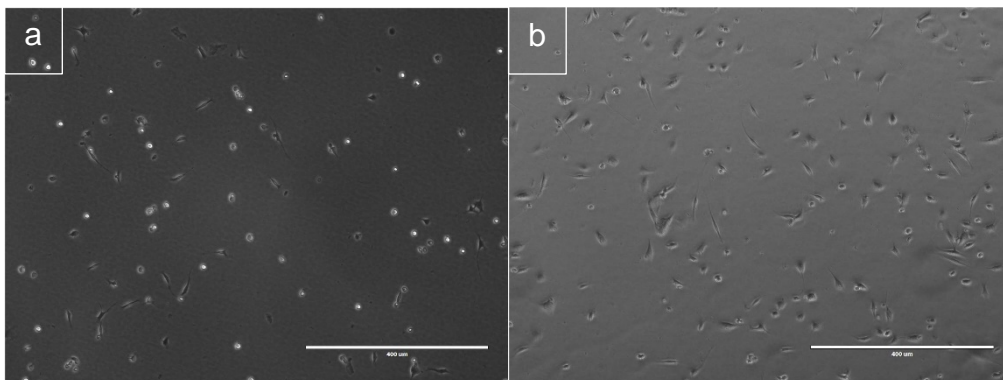


Figure 48 : Images prises en contraste de phase de myoblastes issues d'un rat WT (a) et d'un rat DMD (b) âgé d'1 mois après 24h de culture, échelle 400 µm.



Nous remarquons que, dans la plupart des cas, après 12h-18h d'ensemencement, que les myoblastes DMD sont plus adhérents et plus étalés que les myoblastes WT, qui eux, sont plus ronds.

### 3. Mesures expérimentales :

Les mesures par AFM sur myoblastes, les immunomarquages, ainsi que les acquisitions vidéo de migration sont effectuées 24h après l'ensemencement (Day 1, Figure 34).

Pour les mesures sur myotubes, il faut dans un premier temps attendre que les myoblastes prolifèrent suffisamment pour atteindre la confluence. Pour cela, ils sont laissés dans l'incubateur et sont observés tous les jours. Généralement à J3 après ensemencement, le milieu de culture est changé au profit d'un milieu de différenciation DMEM F12 supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% de PS, et 1% de glutamine. Puis, les cellules sont laissées 1 à 2 jours dans ce milieu de différenciation jusqu'à obtention des myotubes comme le montre la Figure 49.

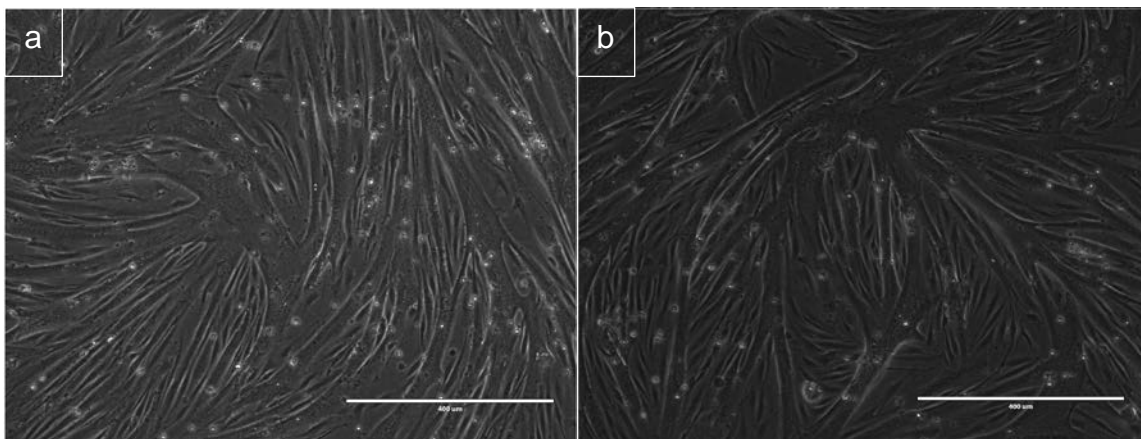


Figure 49 : Images prises en contraste de phase de myotubes issus de rat WT (a) et de rat DMD (b) après 24h de culture, échelle 400  $\mu\text{m}$ .

Ces myotubes sont ensuite soit caractérisés par AFM soit destinés à être fixés puis marqués suivant le protocole décrit dans la section Immunomarquages.

#### 3.1. Elastographie ultrasonore :

L'appareil utilisé pour les mesures en élastographie (Figure 50.a) est l'Aixplorer MACH 30 de Supersonic Imagine (Aix-en-Provence, France) (Figure 50.b) qui utilise la sonde SuperLinear<sup>TM</sup> SLH20-6 (Figure 50.c) possédant une plage de fonctionnement de largeur de bande de 6 à 20 MHz centrée sur 11 MHz. Cette sonde a été choisie en prenant en compte la taille du muscle à explorer.

Après préparation des pattes postérieures du rat dont le protocole est détaillé au paragraphe « Préparation du rat pour l'élastographie », nous déposons sur la sonde une couche de gel à base d'eau, l'Aquasonic 100, pour un couplage acoustique optimal entre la sonde et la peau.

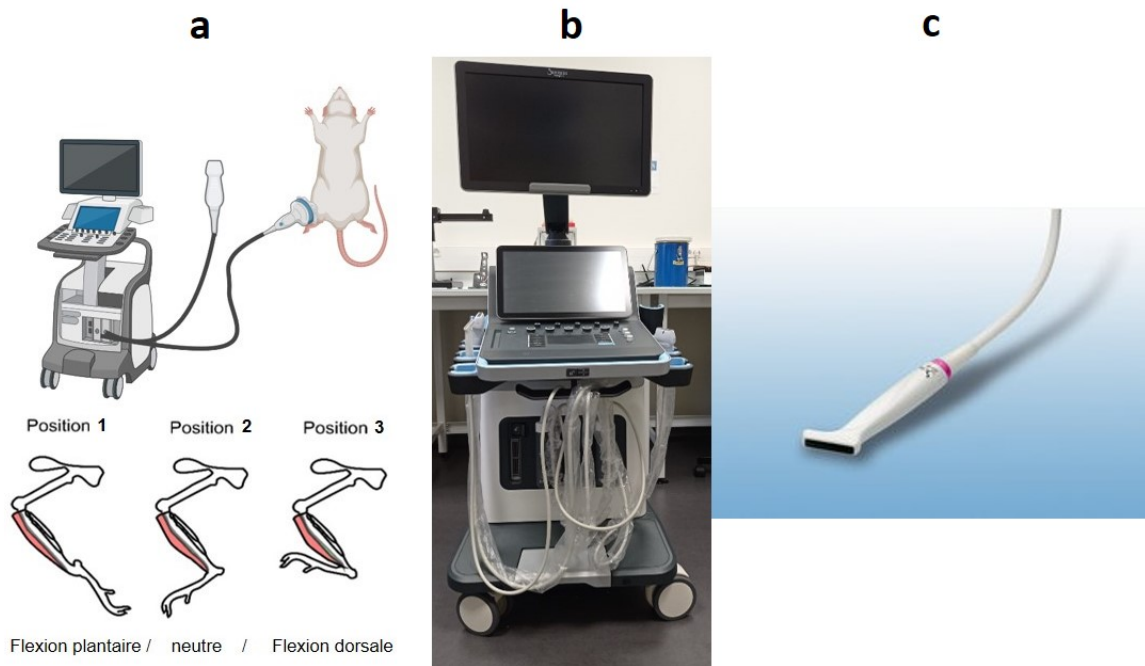


Figure 50 : a. Représentation de l'expérience d'élastographie. b. Elastographe Aixplorer MACH 30 de Supersonic Imagine. c. Sonde SuperLinear™ SLH20-6.

L'élastographie à ondes de cisaillement (Shear wave elastography en anglais), décrite en détail dans l'Introduction est une technique qui utilise des ondes pour évaluer la rigidité ou la dureté des tissus du corps. L'utilisation d'un mode superposé avec le mode B (mode en contraste de phase pour Brightness Mode imaging) peut aider à améliorer la visualisation de l'organe ciblé et à mieux comprendre les résultats obtenus.

La fiabilité de cette technique a été établie par des études telles que celle de (Lacourpaille et al., 2012), qui ont montré que l'élastographie à ondes de cisaillement peut être utilisée pour évaluer de manière adaptée les propriétés mécaniques des muscles squelettiques. En plaçant la sonde sur la patte postérieure et en alignant le quadrant de mesure avec le muscle TA, il est possible d'obtenir la rigidité de ce muscle en particulier (Figure 51).

Pour finir, 25 mesures sont effectuées par position et par patte postérieure, ce qui fait au total 150 mesures par rat.

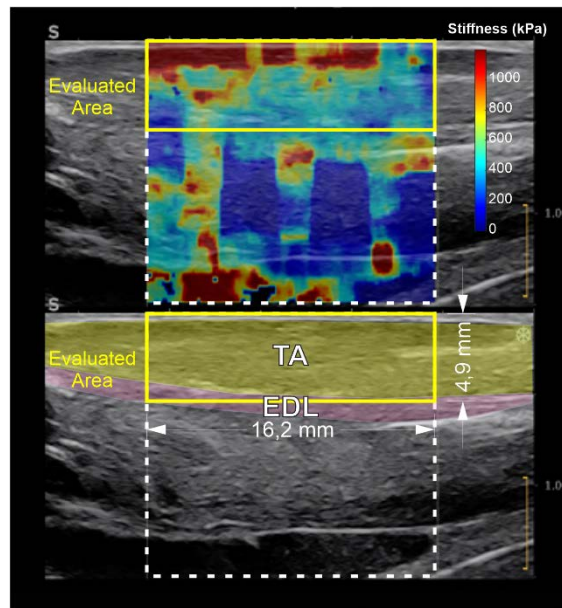


Figure 51 : Exemple d'image obtenue lors de l'élastographie du muscle TA (jaune). La surface évaluée (16,2 mm X 4,9 mm) est encadrée en jaune. Le muscle EDL est représenté lui aussi (rose).

Les données DICOM sont ensuite extraites et analysées par un programme Matlab<sup>®</sup> développé au laboratoire. Celui-ci récupère les données quantitatives fournies par l'appareil et donne en sortie la valeur moyenne de la rigidité sur le quadrant sélectionné.

Ces données d'élastographie sont collectées dans un fichier Excel et les figures et les statistiques sont réalisées grâce au logiciel Prism de GraphPad.

### 3.2. Microscopie à force atomique :

#### 3.2.1. *Plateforme AFM, paramètres utilisés et calibration :*

Les propriétés élastiques et viscoélastiques des myoblastes, myotubes et fibres sont obtenues en effectuant des expériences d'indentation et de relaxation avec un microscope à force atomique (JPK NanoWizard Sence+, Bruker, Billerica, Massachusetts, U.S.A) couplé à un microscope inversé Axio-Observer z1 (Zeiss, Oberkochen, Allemagne) (Figure 52). Une sonde conique  $\mu\text{mash}^{\text{®}}$  CS38 de demi-angle d'ouverture de  $22^{\circ}$  et de constante de raideur du bras de levier de  $0.066 \pm 0.003$  N/m, a été utilisée (Figure 53). La valeur exacte de la constante de raideur du cantilever a été mesurée suivant la méthode du bruit thermique lors de la calibration (Hutter et al., 1993).

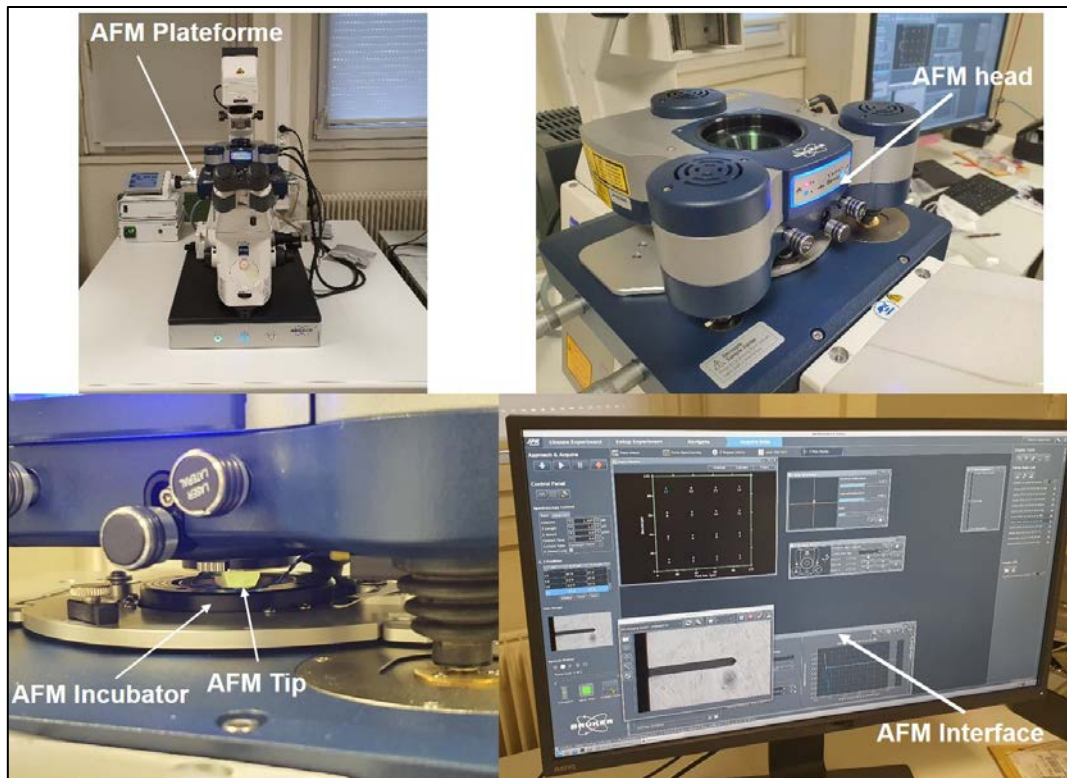


Figure 52 : Photos montrant le Microscope à Force Atomique (AFM) et ses différents composants.

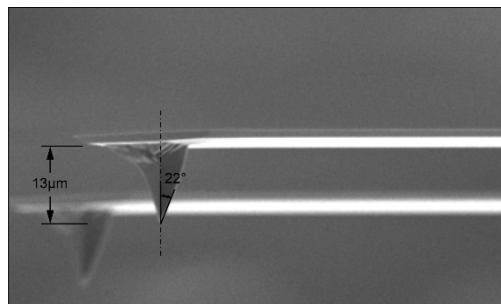


Figure 53 : Vue en microscopie électronique à balayage de la sonde  $\mu$ mash CSC 38 (laboratoire ICMPE, Vitry, UPEC).

### 3.2.2. *Evaluation du module de Young et modèle élastique :*

Les mesures de rigidité sont effectuées après la procédure de calibration. Pour chaque rat sacrifié, la rigidité de 10 à 13 myoblastes et myotubes a été mesurée. Pour chaque myoblaste, 224 indentations ont été effectuées sur une zone carrée de  $15 \times 15 \mu\text{m}$  soit  $1 \mu\text{m}$  de distance entre chaque indentation (Figure 54.a). De même, pour chaque myotube, 504 indentations ont été effectuées sur une zone rectangulaire de  $12 \times 42 \mu\text{m}$  soit  $1 \mu\text{m}$  de distance entre chaque indentation (Figure 54.b). Concernant les fibres musculaires, 2 à 3 fibres ont été isolées mécaniquement de chaque rat et évaluées par 4096 indentations sur une zone de  $12 \times 12 \mu\text{m}$  soit  $0.1875 \mu\text{m}$  de distance entre chaque indentation (Figure 54.c).

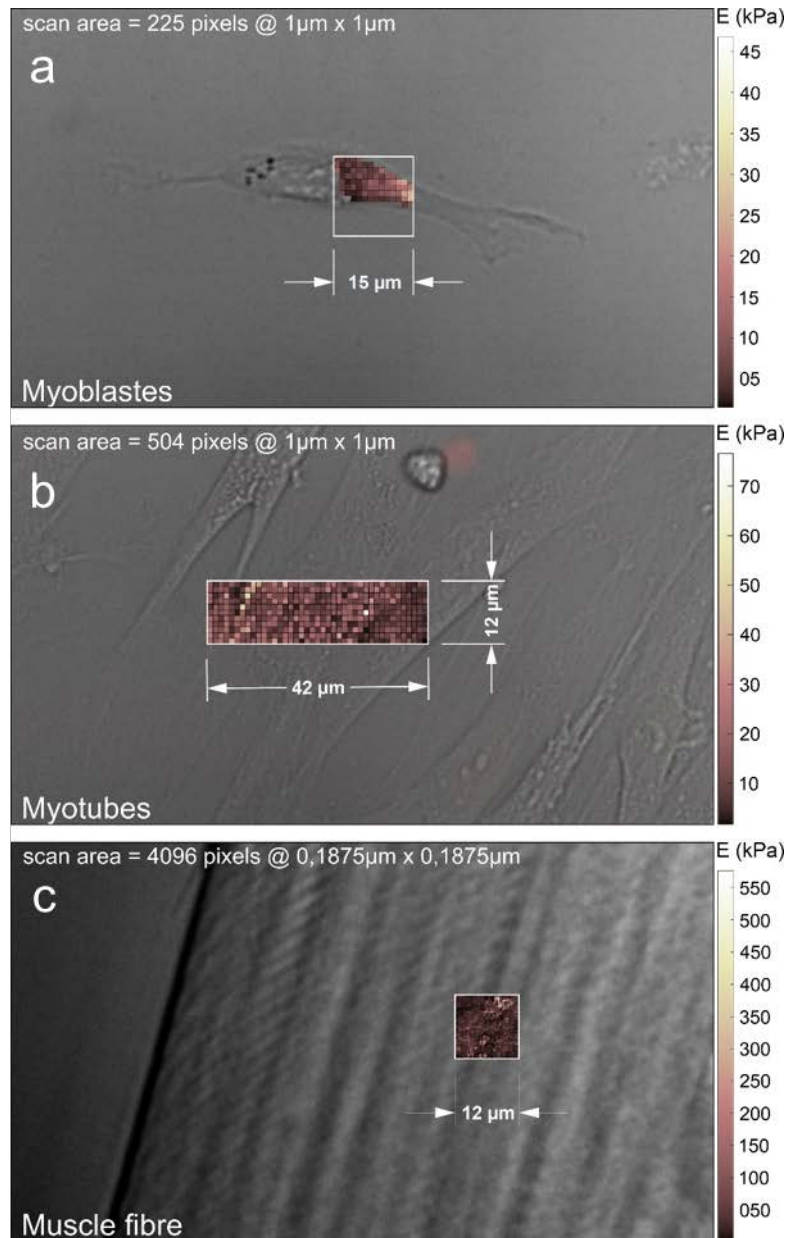


Figure 54 : Images en contraste de phase lors des mesures de la rigidité des myoblastes (a), myotubes (b) et fibre musculaire (c). Les surfaces mesurées avec échelle du module d'élasticité, le nombre de points indentés (pixels) et la résolution sont affichés.

Pour chaque indentation une courbe force-distance est enregistrée, puis analysée à l'aide d'un programme développé au laboratoire doté d'une interface graphique et écrit sous Matlab® (Figure 55). A noter que j'ai participé tout au long de la thèse à l'amélioration et à l'adaptation de ce logiciel.



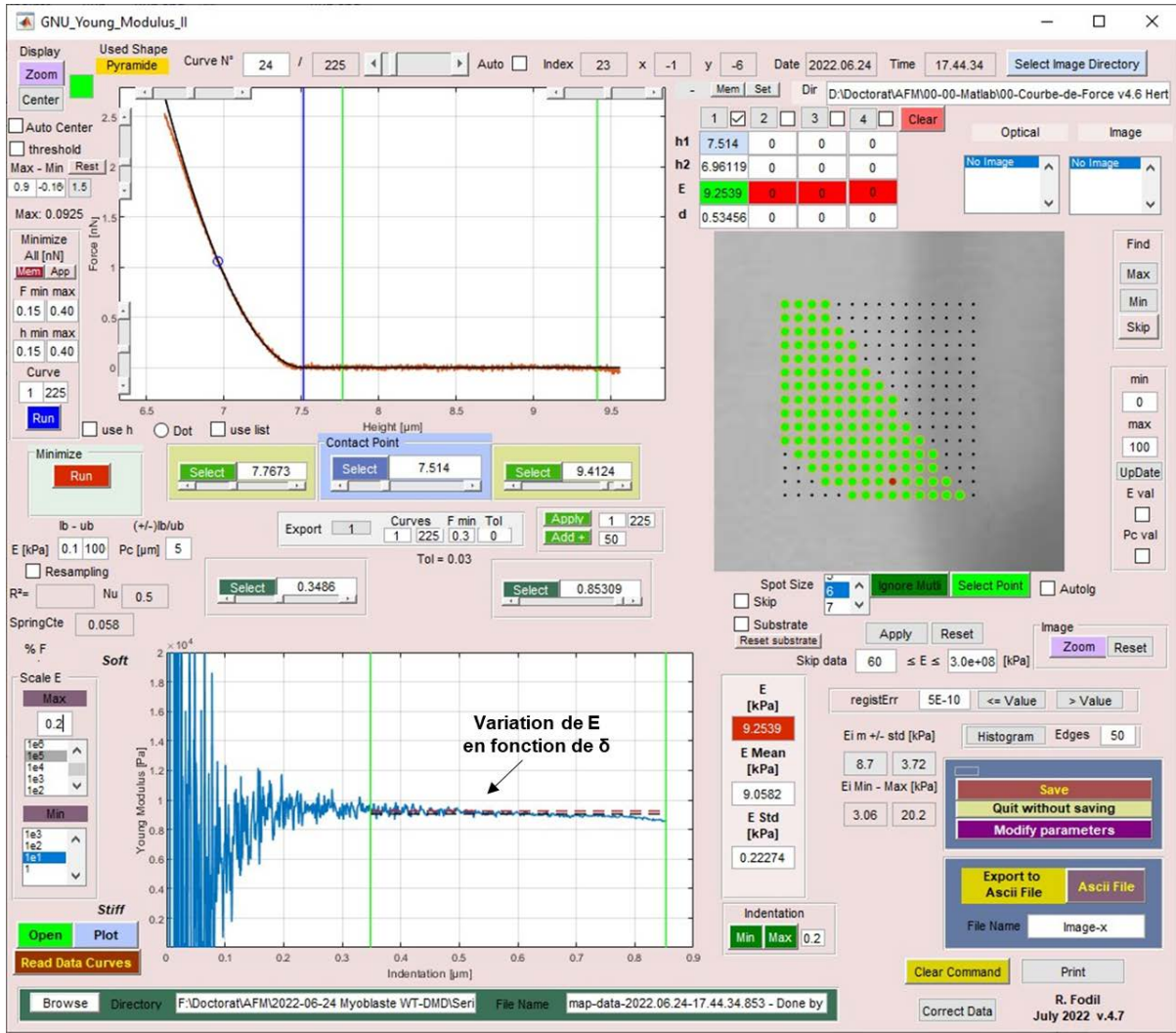


Figure 55 : Impression d'écran de l'interface graphique du programme Matlab<sup>®</sup> développée au laboratoire et utilisée pour analyser les mesures de rigidité. Un exemple est montré sur un myoblaste.

Ce programme permet d'extraire diverses informations dont principalement le module d'élasticité  $E$  et le point de contact  $P_c$ . En fonction de la géométrie de la sonde AFM, le programme utilise les équations basées sur le modèle Hertz pour calculer le module d'élasticité  $E$ . Pour mémoire, le modèle de Hertz suppose que la cellule est un corps lisse, homogène et purement élastique, que la sonde est axisymétrique, infiniment rigide, et que la surface de la cellule est plane, ce qui signifie que l'axe principal de la sonde est toujours perpendiculaire à la surface de la cellule. L'équation proposée par Bilodeau (Bilodeau GG, 1992) pour une pointe AFM pyramidale régulière à 4 côtés telle que celle utilisée dans ce travail, est :

$$F(\delta) = \frac{3}{4} \frac{E}{(1-\nu^2)} \delta^2 \tan(\alpha) \quad (7)$$

Où  $F$  est la force appliquée,  $E$  le module élastique de la cellule,  $\nu$  le coefficient de Poisson,  $\alpha$  le demi-angle d'ouverture de la pointe et  $\delta$  l'indentation. De plus, afin de consolider l'hypothèse

selon laquelle la cellule peut être considérée comme un matériau élastique, la courbe module de Young-indentation est tracée sur l'interface graphique du programme d'analyse (Figure 55). On observe que le module de Young reste quasi constant sur la plage d'indentation ce qui valide l'hypothèse initiale (Figure 55). Enfin nous avons considéré  $\nu = 0.5$ .

A partir de ces informations, à savoir, module d'élasticité et coordonnées 3D du point de contact, il est possible d'obtenir une cartographie de la rigidité et de la topographie ainsi qu'une reconstruction 3D de la zone évaluée à la surface de la cellule voir (Figure 56).

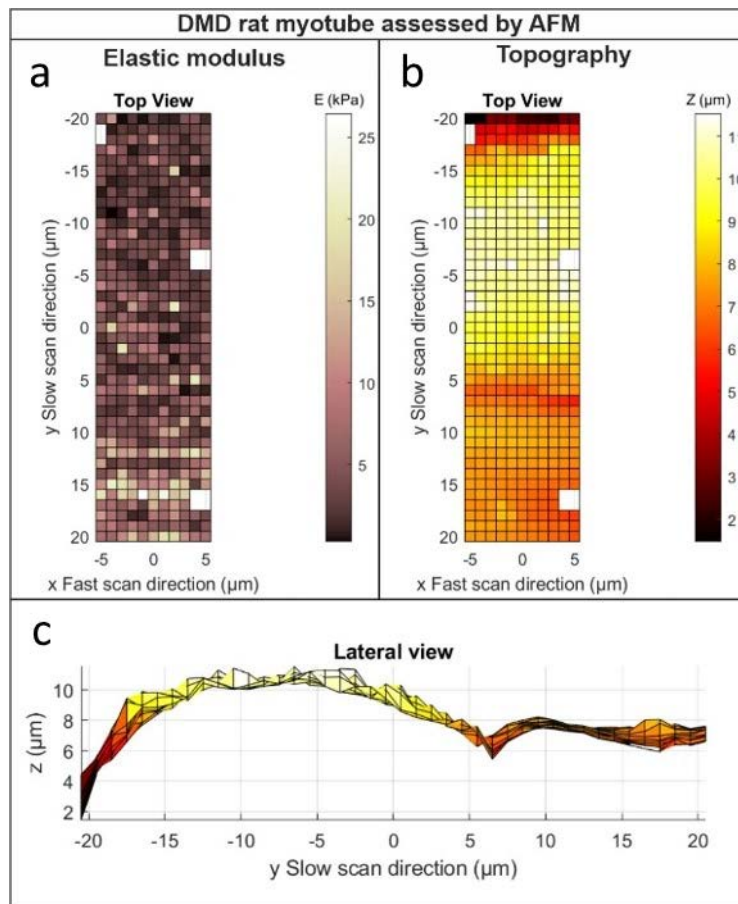


Figure 56 : Cartographie du module l'élasticité (a), de la topographie (b) et une vue latérale (c) d'un myotube DMD mesuré par AFM.

Pour les fibres musculaires, une subroutine en Matlab<sup>®</sup> permet de visualiser et de tracer le profil de la répartition des modules de Young le long d'une ligne choisie, ceci nous permet d'observer les variations de la rigidité sous forme de striations à la surface des fibres musculaires (Figure 57. c, d, e)

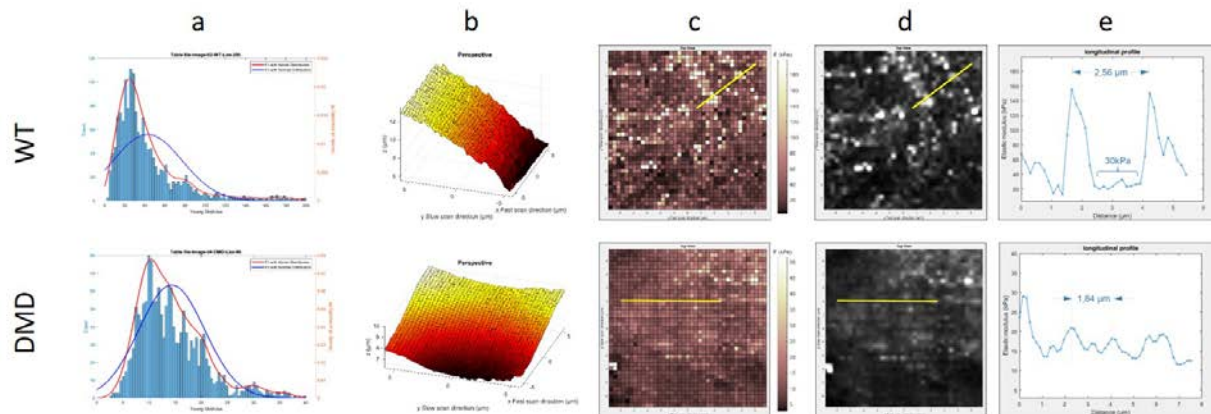


Figure 57 : Exemple de résultats obtenus pour une fibre. a. Distribution des modules d'élasticité. La courbe rouge est relative à la valeur modale, tandis que la courbe bleue est relative à la valeur moyenne. b. Topographie en 3D. c. Cartographie discrète de l'élasticité associée à une échelle de couleurs. d. Cartographie continue de l'élasticité associée à une échelle de gris. La ligne jaune représente une ligne dessinée afin de suivre le module d'élasticité. e. Suivi du module d'élasticité le long de la ligne dessinée en c et d.

Pour chaque mesure, que ce soit sur myoblastes, myotubes ou fibres musculaires, nous obtenons une distribution des modules d'élasticité. Ces modules d'élasticité sont corrigés à l'aide d'une loi qui prend en considération l'effet de l'angle local sur la mesure d'élasticité (voir article en Annexe).

Après cela, nous approchons la distribution obtenue à l'aide d'un fit modal par le calcul d'un coefficient d'asymétrie (Ex : Figure 57.a). Ceci est expliqué un peu plus bas.

### 3.2.3. *Effet de l'inclinaison locale à la surface des cellules sur les mesures AFM :*

Outre la réponse complexe des cellules à la contrainte mécanique appliquée, l'interprétation des résultats est rendue difficile en raison de la diversité des formes cellulaires, qui peuvent varier de la forme ronde à la forme étalée. La morphologie des cellules peut influencer leurs propriétés mécaniques, ce qui nécessite un examen et une analyse minutieuse lors de l'interprétation des données AFM (Efremov et al., 2019; Galbraith et al., 1998). L'organisation du cytosquelette dans les cellules présente un degré élevé de variabilité, qui est influencé par des facteurs tels que le phénotype, la fonction cellulaire, l'état d'activation concernant les interactions avec le milieu environnant ainsi que l'étape de maturité (Féréol et al., 2009; Daniel A. Fletcher et al., 2010). Dans de telles circonstances, la géométrie locale entre la surface de la cellule et la sonde de contact pendant une mesure AFM peut être d'une complexité variable. À ce jour, la solution hertzienne modifiée proposée par Sneddon a été largement utilisée dans de nombreuses études impliquant l'évaluation du module de Young des cellules à l'aide de l'AFM (Sneddon et al., 1965). Cette solution fournit un cadre mathématique pour l'estimation des propriétés élastiques



des cellules sur la base des données d'indentation obtenues lors d'expériences AFM. Elle a servi d'approche fondamentale pour la quantification de la rigidité des cellules dans de nombreuses recherches. En effet, comme nous l'avons déjà cité, l'une des hypothèses de la solution hertzienne modifiée est qu'un milieu élastique « plan » remplit un demi-espace infini. Cependant, il est important de reconnaître que cette hypothèse n'est pas toujours valable dans le contexte de la mesure de la surface d'une cellule. Les surfaces cellulaires peuvent présenter des topographies non planes et hétérogènes, ce qui peut compliquer l'application précise de la solution hertzienne modifiée. Cette limitation doit être prise en compte lors de l'interprétation des données AFM obtenues à partir des mesures de la surface des cellules. Dans les situations où l'hypothèse d'une surface plane n'est pas valable, l'évaluation de la rigidité à l'aide de la théorie de Hertz dans un contexte non plan peut introduire des erreurs. Nous avons pris note de cette limitation et nous nous sommes efforcés d'estimer et de quantifier l'ampleur de ces erreurs. Pour résoudre ce problème, nous avons utilisé plusieurs approches, y compris un cadre théorique pour développer des corrections aux lois de Hertz qui tiennent compte de la nature non plane de la surface cellulaire. En particulier, nous avons formulé des corrections pour les indenteurs coniques et sphériques, qui sont couramment utilisés dans les expériences AFM. En prime des approches théoriques, nous avons utilisé des techniques de simulation par éléments finis pour évaluer l'impact de l'inclinaison locale sur un milieu élastique lorsqu'il est pénétré par un corps rigide axisymétrique conique ou sphérique. Les simulations numériques de l'interaction mécanique entre le pénétrateur et la surface cellulaire non plane nous ont permis de mieux comprendre les effets de la courbure de la surface et de l'inclinaison locale sur la rigidité mesurée. Cette approche numérique nous a fourni des informations précieuses sur les complexités de la mécanique cellulaire et a permis d'affiner les méthodes de correction pour une évaluation précise de la rigidité dans des contextes non-planaires. Enfin, nous avons utilisé une approche impliquant des mesures AFM sur des gels de polyacrylamide inclinés pour évaluer expérimentalement l'influence de l'inclinaison de la surface de contact sur les mesures du module d'Young. En inclinant volontairement la surface du gel et en effectuant des tests d'indentation AFM, nous avons pu observer et quantifier directement l'effet de l'inclinaison de la surface sur le module d'Young calculé. Cette approche expérimentale fournit des données empiriques qui complètent les études théoriques et celles basées sur la simulation numérique, permettant une compréhension plus complète de l'effet de l'inclinaison de la surface de contact sur les mesures de rigidité dans des conditions non planes. Ce travail sur l'effet de l'inclinaison locale dans les mesures AFM est détaillé dans un article présenté en annexe. Il sera soumis en vue d'être publié. Les résultats de cette étude pourraient contribuer à une meilleure

compréhension de ce sujet de la part de la communauté scientifique et fournir des informations précieuses dans ce domaine.

Concrètement, la mesure AFM effectuée sur une cellule nous permet d'obtenir les cartographies des modules d'élasticité ainsi que de la topographie (Figure 58.a et b). Grâce à la cartographie de la topographie, nous obtenons, pour chaque point, une distribution des angles locaux en prenant en considération les altitudes des points avoisinants (Figure 58.c). Un facteur de correction est ensuite calculé pour chaque angle (Figure 58.d et e), et est appliqué à chaque point de mesure. On notera que le calcul de ce facteur tient compte de l'angle d'inclinaison naturelle du levier qui est de 10°. Nous obtenons ainsi une nouvelle distribution corrigée qui prend en considération l'effet de l'angle d'inclinaison (Figure 58.f).

Lorsque nous utilisons une sonde pyramidale comme indenteur, une augmentation de l'angle d'inclinaison local entraîne une surestimation du module de Young apparent, qui est calculé à partir de la loi de Hertz classique. Pour corriger cela, nous avons calculé un coefficient de correction en fonction de l'angle local entre la sonde pyramidale et la surface de l'échantillon. Nous avons obtenu le module de Young corrigé en divisant le module de Young apparent par ce coefficient de correction (voir Annexes). La Figure 59 présente l'écart en pourcentage entre le module de Young apparent et le module de Young corrigé  $(E_{app} - E_{corr})/E_{app} \times 100$ . Nous observons que l'écart moyen semble varier en fonction de la forme de l'échantillon mesuré, avec des valeurs par rat de 7,6%, 3,9% et 8,6% respectivement pour les myoblastes, les myotubes et les fibres musculaires.

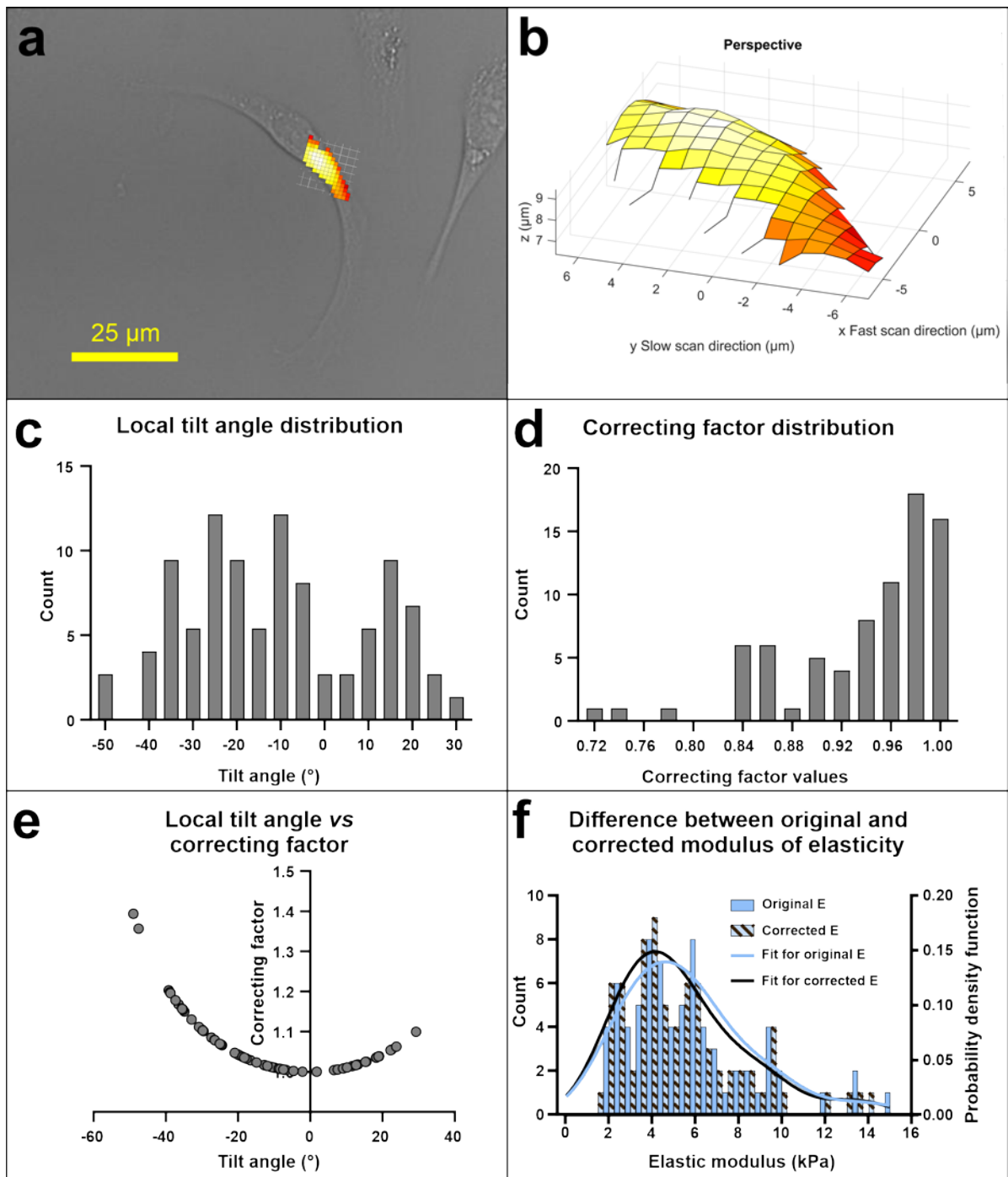


Figure 58 : Exemple des résultats obtenus lors d'une mesure. a. Surface mesurée d'un myoblaste, la barre d'échelle indique 25  $\mu\text{m}$ . b. Reconstruction 3D de la topographie du myoblaste mesuré. c. Distribution des angles d'inclinaison locaux. d. Distribution des facteurs de correction à appliquer. e. Figure montrant l'évolution du facteur de correction en fonction de l'angle d'inclinaison local. f. Différence entre la distribution originale et la distribution corrigée des modules d'élasticité de notre mesure.

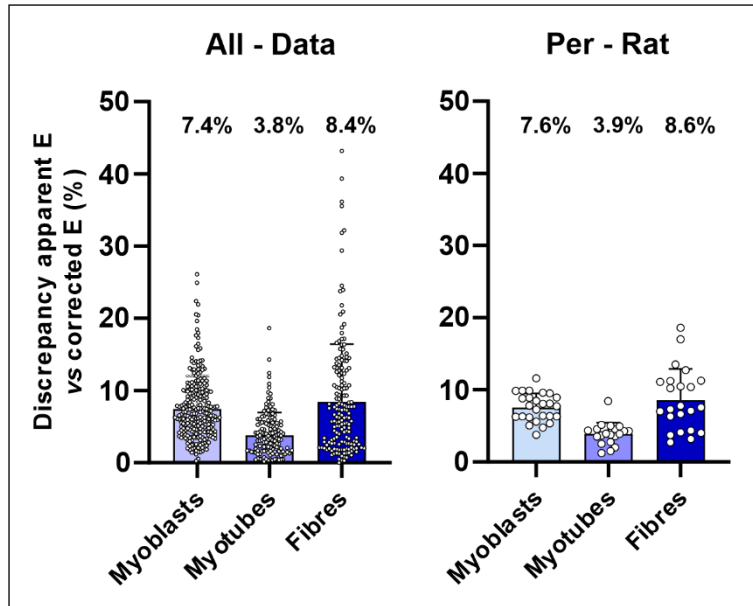


Figure 59 : Ecart moyen (+ écart type) en %, présenté pour toutes les données et par rat, entre le module de Young apparent calculé par la formule classique de Hertz et le module de Young corrigé qui prend en compte l'inclinaison locale entre la sonde AFM et la surface de l'échantillon.

### 3.2.4. Distribution des données et calcul de la valeur modale :

Comme nous l'avons indiqué plus haut, pour chaque distribution, nous avons calculé le coefficient d'asymétrie (skewness en anglais) défini par la relation suivante :

$$s = \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (E_i - E_m)^3}{\left( \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (E_i - E_m)^2 \right)^{3/2}} \quad (8)$$

Avec  $E_i$ , les modules de Young de la distribution,  $E_m$  la moyenne arithmétique des modules de Young de la distribution et  $n$  le nombre de valeurs.

Nous avons constaté que le coefficient d'asymétrie était quasiment toujours  $> 0$ , ce qui signifie que nos distributions sont décalées à gauche de la médiane avec une queue de distribution étalée vers la droite (voir Figure 60 et Figure 62)

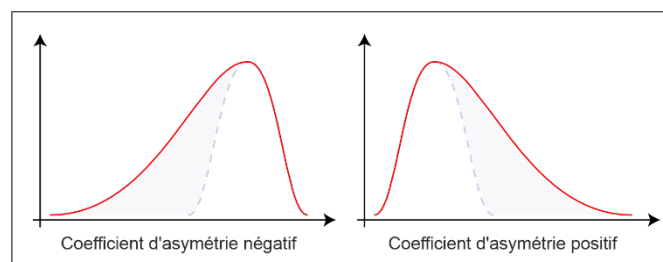


Figure 60 : Coefficient d'asymétrie (skewness en anglais), mesure l'asymétrie de la distribution d'une variable aléatoire réelle.

Compte tenu de cette dernière observation, nous avons opté pour un ajustement sur la valeur modale de nos distributions. Pour rappel, le terme "valeur modale" fait référence à la valeur la plus fréquente dans un ensemble de données numériques. En pratique, nous avons utilisé la fonction « *fitdist()* » de Matlab® qui effectue une estimation de la fonction de densité de probabilité non paramétrique utilisant une fonction de lissage par noyau (Figure 61). La bande passante de la fenêtre de lissage du noyau ou le paramètre de lissage du noyau  $Ker$  ont été définis selon la formule :

$$Ker = E_{max}/25 \quad (9)$$

où  $E_{max}$  est la valeur maximale du module d'élasticité pour chaque distribution.

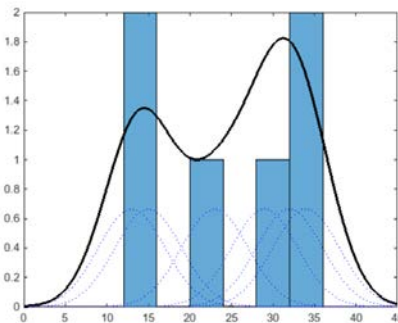


Figure 61 : Exemple de fonction de densité de probabilité par noyau utilisée pour calculer la valeur modale de nos distributions.

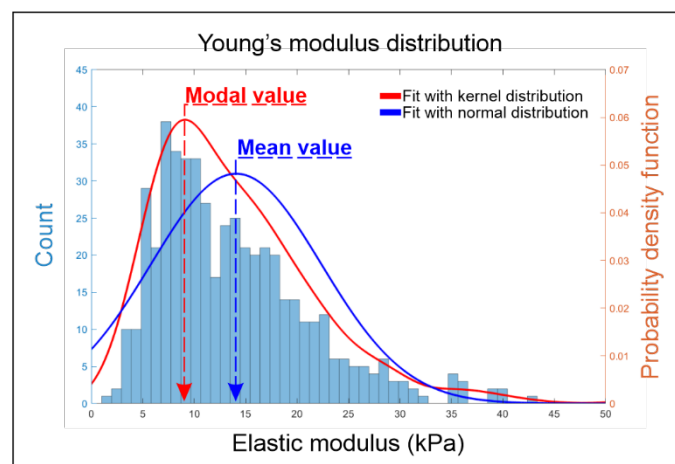


Figure 62 : Distribution du module d'élasticité sur un myotube. Ajustement par une loi normale (bleu) et par la fonction de lissage par noyau (rouge).

Ces valeurs modales sont ensuite extraites et répertoriées dans un tableau Excel puis sur Prism GraphPad tel que montré dans le chapitre résultats. Pour rappel, chaque distribution représente une mesure sur une cellule.

### 3.2.5. *Tests de relaxation et modèle viscoélastique :*

Afin d'évaluer les propriétés viscoélastiques de la cellule, les courbes force-temps ont été analysées en utilisant le modèle viscoélastique de Maxwell-Wiechert généralisé du second ordre (Figure 11). Ce modèle a été choisi car il donnait le meilleur ajustement (fit) avec les courbes expérimentales tout en ayant le minimum d'éléments (paramètres) (Figure 63.e). En résumé, nous obtenons les paramètres de l'équation de Maxwell-Wiechert à l'aide d'un ajustement par la méthode des moindres carrés de la relation reliant la contrainte  $\sigma$  à la déformation, qui elle-même est déduite des courbes force-temps.

Plus en détails, pendant la mesure, la position de la pointe AFM à la surface de la cellule est contrôlée visuellement via le microscope optique. Pendant le cycle, dans la direction verticale de la pointe AFM, qui comprend les phases d'approche, la pause et la rétraction, le mode « contrôle de la hauteur » est utilisé. La pointe de l'AFM est déplacée vers la surface de la cellule à une vitesse de 15  $\mu\text{m/s}$  et est maintenue en indentation dans la cellule pendant 10 secondes à une distance verticale de 2.5  $\mu\text{m}$  du point de contact. Après les 10 secondes, la pointe est retirée de la cellule à la même vitesse et revient à sa position de départ. Pendant la phase de résidence dans la cellule, la relaxation cellulaire se produit, et la courbe force-temps est obtenue en enregistrant la déviation du cantilever.

Il faut noter que pour déterminer l'ajustement de la relation contrainte-déformation, nous avons considéré que la variation de l'indentation au cours de l'expérience définie par l'équation (10) est négligeable.

$$\delta(t) = P_c - z_{cantilever} - d(t) \quad (10)$$

Où  $P_c$ ,  $z_{cantilever}$ , et  $d$  sont respectivement l'altitude du point de contact, la position  $z$  du cantilever commandé par le moteur piézoélectrique et la déflexion du cantilever. Plus précisément, nous avons observé, comme Darling et al dans leur étude (Darling et al., 2006), que la variation de l'indentation, au cours du test de relaxation, était au maximum d'environ 5% (Figure 63.f). On remarquera que le fait de négliger les variations de l'indentation durant la phase de relaxation suggère que les propriétés viscoélastiques, déduites par l'ajustement de la

courbe contrainte-relaxation par le modèle de Maxwell-Wiechert, contiennent une légère erreur, comme d'ailleurs l'ont déjà fait remarquer Darling et al (Darling et al., 2006).

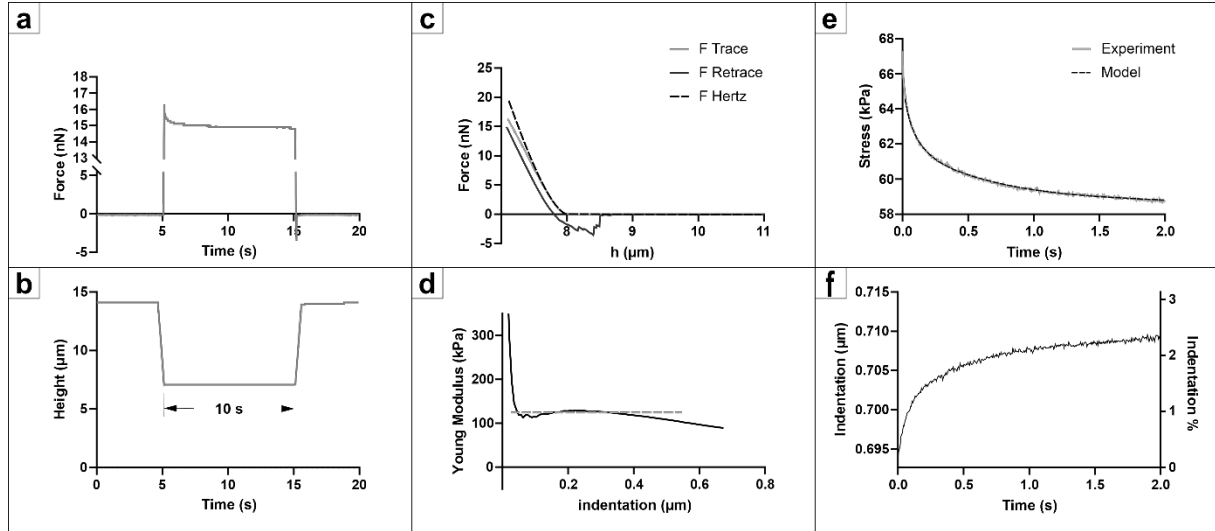


Figure 63 : a. Exemple de test de relaxation par AFM sur un temps de 10s effectué sur des fibres musculaires de l'Extenseur Digitorum Longus (EDL) de rat WT ou DMD. b. Mesure de la position du bras de levier AFM suivant l'axe z en fonction du temps en appliquant une vitesse d'indentation et de retrait à 15μm/s. Cette courbe montre que l'indentation est maintenue quasi constante pendant 10 secondes. c. Courbes de spectroscopie de force montrées en ligne pointillée représente l'ajustement par la loi de Hertz, en gris clair montre la courbe d'approche et en noire montre la courbe de retrait. d. Evolution de la rigidité en fonction de l'indentation, montrant que la rigidité est quasi-constante sur la gamme d'indentation considérée dans ce travail. e. Ajustement de la courbe contrainte-temps par le modèle de Maxwell-Wiechert sur un temps de 2s. f. Evaluation de la variation de l'indentation en μm et en % pendant le test de relaxation sur un temps de 2s.

Nous savons que la contrainte est reliée à la force par :

$$\sigma(t) = \frac{F(t)}{A} \quad (11)$$

Pour déterminer la surface  $A$  sur laquelle la force  $F$  est appliquée, la pointe AFM est considérée comme une pyramide de base  $b$ , de demi-angle d'ouverture  $\alpha$  et de hauteur  $\delta$  comme indiqué sur la Figure 64:

$$a = \delta \cdot \tan \alpha \quad \text{and} \quad A = b^2 = 2 \cdot [\delta \cdot \tan \alpha]^2$$

Ainsi,

$$\sigma(t) = \frac{F(t)}{2 \cdot [\delta \cdot \tan \alpha]^2} \quad (12)$$

Pour déterminer la déformation  $\varepsilon$ , la cellule est considérée comme un parallélépipède rectangle avec d'une part, une base de section carrée de côté  $b$  et d'autre part, une hauteur  $h_{\text{Cell}}$  comme indiqué sur la Figure 64.

Le volume du parallélépipède rectangle est donné par :

$$V_{para} = A \cdot h_{cell} \quad (13)$$

Et le volume de la pyramide par :

$$V_{pyr} = \frac{1}{3} \cdot A \cdot \delta \quad (14)$$

Le volume cellulaire pendant l'indentation est donné par :

$$V = V_{para} - V_{pyr} \quad (15)$$

La déformation peut être définie par :

$$\varepsilon = \frac{V_0 - V}{V_0} \quad (16)$$

On en déduit que :

$$\varepsilon = \frac{V_{para} - (V_{para} - V_{pyr})}{V_{para}} = \frac{V_{pyr}}{V_{para}} = \frac{1}{3} \cdot \frac{\delta}{h_{cell}} \quad (17)$$

Ainsi,  $\sigma(t)$  et  $\varepsilon(t)$  peuvent être directement calculées à partir des données expérimentales.

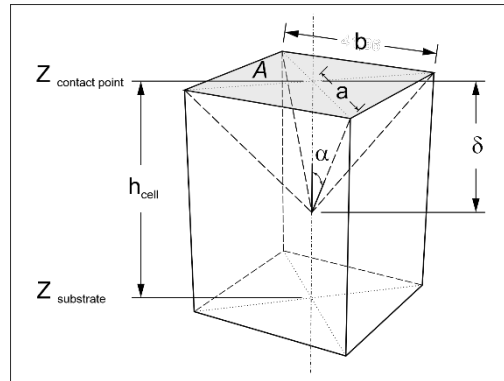


Figure 64 : Schéma de l'indentation d'une pointe pyramidale régulière à 4 côtés dans une cellule représentée par un parallélépipède rectangle à base carrée.

En considérant le cas d'un test en relaxation, les équations caractéristiques du modèle sont :

$$\sigma = \sigma_0 + \sigma_1 + \sigma_2 \quad (18)$$

Avec

$$\sigma_0 = \varepsilon_0 E_\infty \quad (19)$$

Où  $E_\infty$  est le module élastique au temps infini.



La déformation  $\varepsilon$ , pendant le test de relaxation, est maintenue constante par définition, ce qui conduit à considérer :

$$\dot{\varepsilon} = 0 = \frac{\dot{\sigma}_i}{E_i} + \frac{\sigma_i}{\eta_i} \quad (20)$$

avec  $i = 1; 2$

En intégrant l'équation (20), la contrainte  $\sigma$  devient :

$$\sigma_i(t) = \sigma_{i_0} \exp\left(-E_i t / \eta_i\right) = E_i \varepsilon_0 \exp(-t / \tau_i) \quad (21)$$

Où  $\tau_i = \frac{\eta_i}{E_i}$  est le temps de relaxation.

En remplaçant (19 et 21) dans (18), on obtient :

$$\sigma(t) = E_\infty \varepsilon_0 + \sum_{i=1}^2 E_i \varepsilon_0 \exp(-t / \tau_i) \quad (22)$$

Finalement l'équation de Maxwell-Wiechert est obtenue à partir de l'équation (6) en la divisant par  $\varepsilon_0$  :

$$E(t) = E_\infty + \sum_{i=1}^2 E_i \exp(-t / \tau_i) \quad (23)$$

Et donc à partir de la connaissance de la contrainte  $\sigma$  et la déformation  $\varepsilon$ , et en utilisant un programme écrit avec Matlab<sup>®</sup> (Figure 65) qui décrit un modèle de relaxation de Maxwell-Wiechert généralisé composé d'un arrangement en parallèle de deux éléments de Maxwell et d'un ressort (modèle de Zener) (Moreno-Flores et al., 2010), on peut déduire par ajustement de la courbe contrainte-déformation, d'une part, le module élastique de compression  $E_\infty$  au temps infini et, d'autre part, les modules élastiques  $E_1$  et  $E_2$ , et les temps de relaxation du premier et du deuxième compartiment du modèle de Maxwell-Wiechert généralisé du second ordre noté respectivement  $\tau_1$  et  $\tau_2$ . Il est donc aussi possible de déterminer les paramètres de viscosité  $\eta_1$  et  $\eta_2$ . Une moyenne de chacun de ces paramètres est calculée à partir des tests AFM réalisés pour une condition d'expérience donnée. Ces paramètres moyennés sont ensuite introduits dans un modèle de Maxwell-Wiechert. Ainsi, les courbes contrainte-temps et contrainte normalisée-temps sont tracées pour chaque échelle (myoblastes, myotubes, fibres) ainsi que pour chaque type de modèle (WT versus DMD) et âge (1, 6 et 10 mois) de rat.

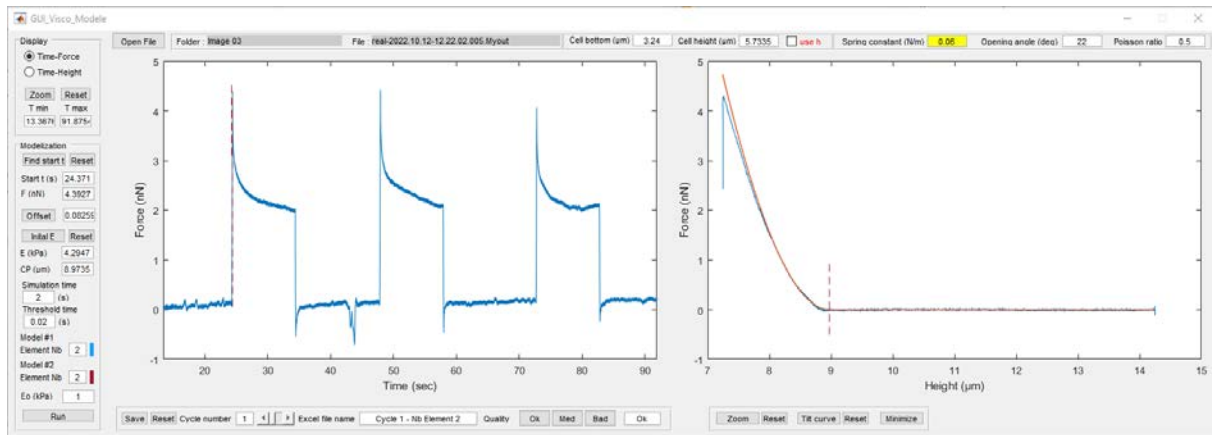


Figure 65 : Capture d'écran du programme Matlab® pour l'analyse des propriétés viscoélastiques. Fenêtre de gauche, courbes de relaxation force-temps. Fenêtre de droite, courbe force-hauteur lors de l'indentation qui est indiquée sur le panneau de gauche par la ligne en pointillé en rouge (E-Hertz).

### 3.3. Single cell RNA-seq :

Afin d'analyser l'expression des gènes de myoblastes (ainsi que d'autres types cellulaires présents dans le muscle tels que les cellules satellites), notre équipe a effectué une expérience de Single cell RNA-seq (scRNA-seq) (Taglietti et al., 2022; Taglietti et al., 2023).

Cette expérience a été réalisée sur des muscles TA issus de rats WT et DMD de 12 mois.

Les TAs ont été dissociés comme décrit dans la partie « Modèles biologiques : ». Après dissociation, les cellules ont été isolées par FACS après incubation avec du 4',6-diamidino-2-phénylindole (D9542, Sigma-Aldrich) pour obtenir une suspension cellulaire sans cellules mortes ni débris. Le scRNA-seq a été réalisé à l'aide d'un kit Chromium Next GEM Single Cell 3'Gene Expression V3 (10X Genomics) en suivant le protocole du fabricant. Le séquençage a été réalisé sur un système Illumina NexSeq 550 avec le High Output Kit v2.5 (75 cycles, Illumina, 20024906). Le démultiplexage des échantillons, l'appel des cellules, la cartographie des transcrits et le comptage de l'expression génique ont été effectués avec logiciel Cell Ranger Software Suite v4.0.0. Les lectures de séquences ont été alignées sur un génome de référence de *Rattus norvegicus* construit à partir de sources Ensembl (EMBL-EBI, Rnor v6.0). La profondeur de séquençage entre les échantillons a été ajustée en réduisant l'échantillonnage (Cell Ranger aggregate) et normalisée à 17 253 lectures à code-barres confidentiellement mappées par cellule. Le regroupement et la réduction des données ont été calculés avec Cell Ranger v4.0. Une première réduction linéaire de la dimension par analyse en composantes principales (ACP) a été calculée pour construire un graphe de voisinage k-NN permettant le regroupement et l'intégration dans un espace réduit. Les projections t-SNE de faible

dimensionnalité ont été calculées sur les 10 premières composantes de l'ACP, avec une perplexité de 30 et un facteur  $\theta$  de 0,5. Les groupes de cellules ont été déterminés par l'algorithme de modularité de Louvain avec des paramètres par défaut. Toutes les analyses secondaires, y compris la visualisation des données, l'étiquetage des groupes de cellules et les tests d'expression différentielle, ont été réalisées avec le Loupe Cell Browser v5.0 (Taglietti et al., 2023).

A la fin, nous obtenons un fichier Excel comprenant l'ensemble des gènes surexprimés ou sous-exprimés chez les myoblastes DMD comparés aux myoblastes WT. Ces gènes sont ensuite classés du plus surexprimé au moins surexprimé. Cette quantification d'expression est indiquée par un taux de variation en échelle logarithmique (Log Fold Change) ainsi qu'une P-Value.

Nous avons ensuite répertorié ces gènes sur une heatmap (Voir la Figure 111 dans les résultats) et nous avons extrait ceux qui sont le plus exprimés chez les WT et les DMD (14 gènes et 13 gènes respectivement). Ces gènes codants pour des protéines ont ensuite été mis dans un tableur où nous avons indiqué les processus biologiques dans lesquels ils sont impliqués, leur type d'élément cellulaire et leur classe de protéine.

#### 3.4. Western Blot :

Nous avons réalisé une étude sur des muscles EDL de rats WT et R-DMDdel52 âgés de 6 mois. Cette expérience a été faite suivant le protocole décrit dans (Taglietti et al., 2022) Les muscles ont été découpés en sections minces appelées cryosections, puis homogénéisés dans un mélange contenant du Tris-HCl 50 mM, du NaCl 100 mM, du NP40 à 0,5% et du cocktail inhibiteur de protéases Halt (Pierce). Les protéines extraites ont été centrifugées et dénaturées dans un tampon Laemmli pendant 30 minutes à température ambiante. Ensuite, les protéines ont été quantifiées à l'aide du test de Bradford (Pierce) et séparées par électrophorèse sur un gel NuPAGE 4-12% Bis-Tris (Life Technologies). Les protéines ont ensuite été transférées sur des membranes de nitrocellulose (GE Healthcare). Les membranes ont été bloquées avec 5% de lait pendant 1 heure à température ambiante, puis des anticorps primaires anti- $\alpha$ -tubuline (Sigma SAB5600206) et anti-desmine (Sigma D1033) ont été appliqués et incubés toute la nuit à 4 °C. Le lendemain, après avoir été lavées, les membranes ont été incubées pendant 1 heure à température ambiante avec des anticorps secondaires correspondant aux anticorps primaires utilisés. Après une incubation de 10 minutes avec une solution de révélation, les images ont été capturées à l'aide d'un appareil de visualisation appelé Chemidoc MP (Biorad). Enfin, les protéines ont été quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ.

### 3.5. Immunomarquages :

Afin de marquer les myoblastes ou les myotubes, une solution de fixation des cellules (pour 3 ml) est préparée contenant 2250  $\mu$ l de formaldéhyde méthanol free à 8%, 0.3 g de sucrose, 750  $\mu$ l de Tampon Phosphate (PB) à 0.4 M. Pour fixer les cellules, il faut ajouter au volume contenu dans le puits cellulaire, le même volume de solution de fixation pendant 10 min à 4°C. La solution finale dans le puits cellulaire contient donc du formaldéhyde méthanol free à 3%, du sucrose à 5% et du PB à 0.05 M. Notons que le sucrose est utilisé afin de préserver la structure du cytosquelette. Après 3 rinçages pendant 4/5 min au PBS, les cellules sont incubées pendant 5 min à température ambiante avec 0.3% de triton 100x dilué dans du PBS. Les puits sont alors rincés avec du PBS 1x pendant 5 min. Afin de saturer les sites non-spécifiques, une solution de BSA à 5% diluée dans du PBS 1x est ajoutée pendant 30 min à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées avec les anticorps primaires anti-paxilline (BD Transduction 610620) et anti- $\alpha$ -tubuline (Sigma SAB5600206) dilués dans de la BSA à 0.3% préparé dans du PBS pendant une nuit à 4°C. Les puits sont rincés 3 $\times$  pendant 5 minutes avec de la BSA à 0.3% préparé dans du PBS. Les cellules sont alors incubées avec les anticorps secondaires et éventuellement une solution de rhodamine-phalloïdine (diluée 1/200) et du DAPI dilué au 1/5000 dans de la BSA à 0.3% préparée dans du PBS pendant une heure à température ambiante et dans le noir. Les puits sont finalement rincés 3 $\times$  avec du PBS, démontés, et les lames supports sont alors recouvertes d'un milieu de montage Fluoromount puis d'une lamelle de verre. Le montage lame-lamelle est laissé à sécher et conservé à 4°C.

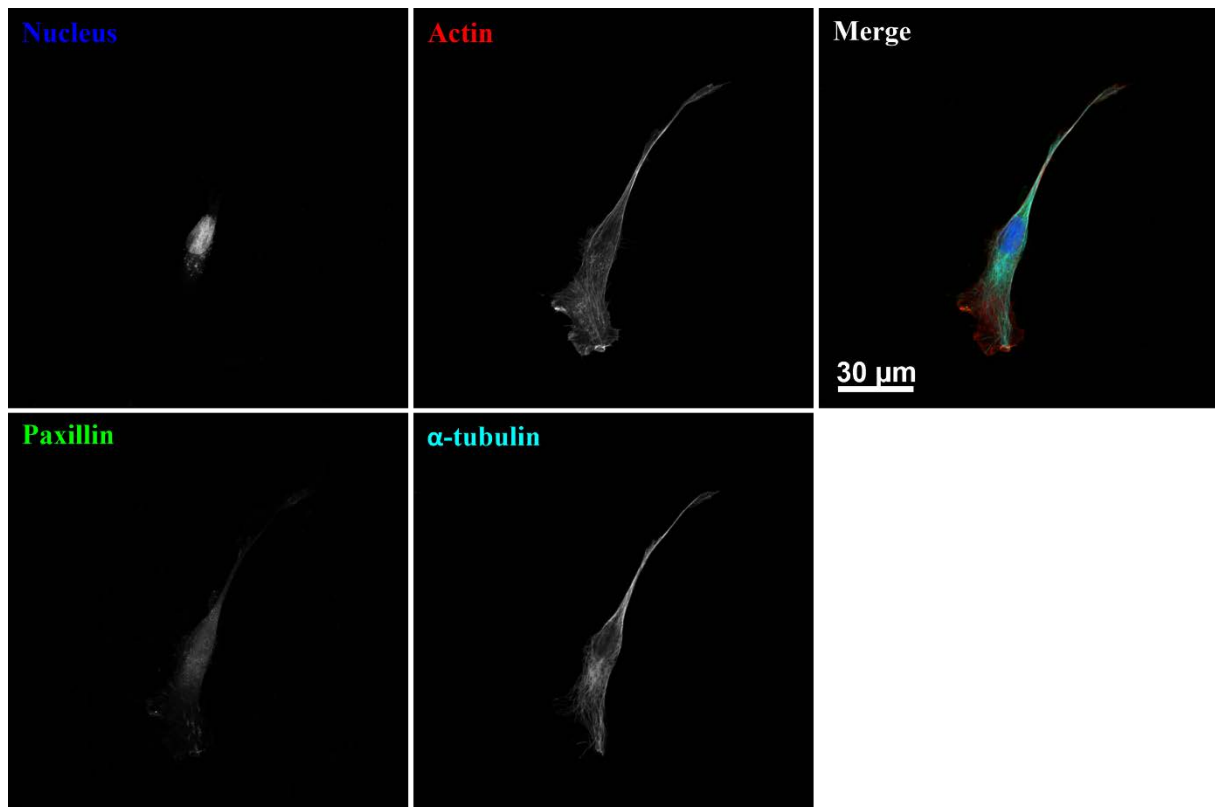


Figure 66 : Immunomarquage réalisé sur un myoblaste DMD âgé de 6 mois. 4 canaux différents ont été utilisés pour visualiser différentes structures, le canal bleu pour visualiser le noyau marqué au DAPI, le canal rouge pour visualiser les filaments d'actine grâce à la rhodamine phalloïdine, le canal vert pour visualiser la paxilline et le canal cyan pour visualiser l'alpha tubuline.

### 3.6. Calcul de la surface des myoblastes :

La surface des myoblastes a été évaluée à partir de l'image du cytosquelette d'actine des myoblastes marqués, prise au microscope confocal. A l'aide du logiciel imageJ, l'image a d'abord été segmentée pour extraire le contour de la cellule, puis, un programme écrit dans notre équipe détermine la surface en pixel à partir de la connaissance de ce contour. La surface en micromètre carré a été obtenue en multipliant la surface en pixel par la résolution de l'image, c'est-à-dire par  $0.006084 \mu\text{m}^2/\text{pixel}$ .

### 3.7. Calcul du taux d'actine :

Le taux d'actine est déterminé en effectuant une division entre la surface des filaments d'actine, qui encadrent la forme des filaments d'actine (représentés en tant qu'actine dense dans l'image), et la surface totale de la cellule. La mesure de la surface des filaments d'actine est réalisée à l'aide d'un programme Matlab<sup>®</sup> qui applique un seuil de 25% sur l'histogramme des intensités des niveaux de gris. Ce seuil nous permet de mettre en évidence les structures d'actine dense, telles que les fibres de stress, les filopodes et les lamellipodes (voir Figure 67).

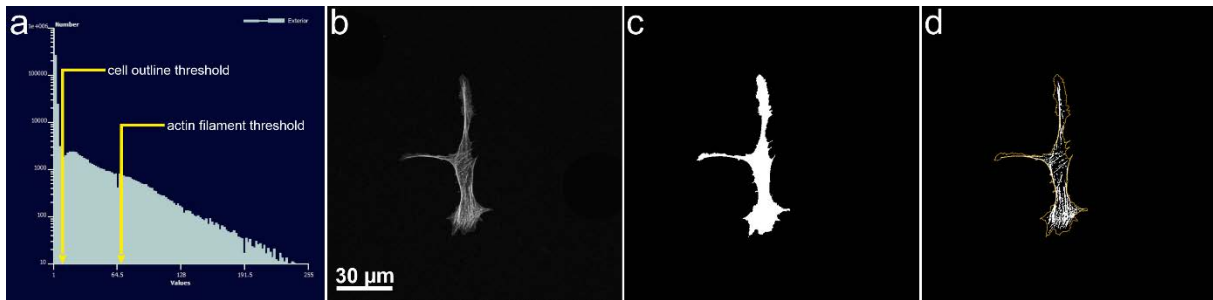


Figure 67 : a. Histogramme de la répartition des niveaux de gris dans l'image d'un myoblaste DMD de 6 mois avec les deux seuils utilisés. Le premier seuil est utilisé pour détecter le contour de la cellule, ce qui nous permet de calculer sa surface. Le deuxième seuil est positionné à 25% de la plage dynamique de l'image et permet de détecter l'actine dense, mettant ainsi en évidence les fibres de stress (Fodil et al., 2003). b. Image originale du marquage de la f-actine par la rhodamine phalloïdine. c. Surface de la cellule capturée par le premier seuil. d. Surface de l'actine dense capturée par le second seuil.

### 3.8. Calcul du nombre et de la taille des spots de paxilline :

Pour le calcul du nombre et de la taille des spots de paxilline, nous avons, de la même façon, utilisé les images confocales des marquages du cytosquelette d'actine et de la paxilline. Ces deux images ont été traitées avec un programme écrit en langage Matlab® développé au laboratoire, suivant le processus décrit sur la figure ci-dessous (Figure 68). On notera que les objets de taille inférieure à 10 pixels, c'est-à-dire inférieure à  $0.06084 \mu\text{m}^2$ , ont été exclus du décompte, pour ne pas confondre le marquage de la paxilline avec le bruit de fond de l'image.

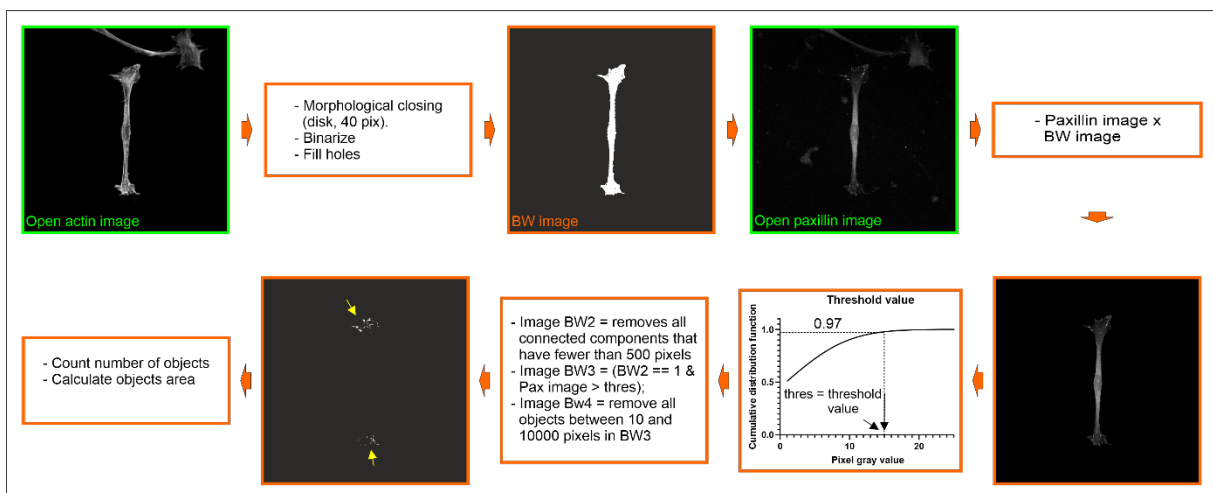


Figure 68: Processus utilisé pour le calcul du nombre de spots de paxilline et de leur surface à partir d'images acquises en microscopie confocale.

### 3.9. Analyse de la prolifération et de la migration :

La migration cellulaire représente une des fonctions importantes du myoblaste. Il nous est alors apparu intéressant de caractériser cette fonction en parallèle de la caractérisation de la structure du cytosquelette et des propriétés mécaniques des myoblastes. Ceci s'inscrit dans la perspective

de comprendre la relation structure du cytosquelette – propriétés mécaniques – fonction biologique comme illustré sur le schéma Figure 21 dans l'Introduction. Pour ce faire, nous avons utilisé la vidéo-microscopie. Concrètement, les myoblastes, issus des rats WT et DMD, sont ensemencés dans des puits Sarstedt suivant le protocole décrit au paragraphe Culture cellulaire :, puis placés dans un incubateur à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> qui repose sur la platine d'un microscope Leica DMIRE2 auquel est associée une caméra CoolSnap HQ. Pour chaque expérience (n = 1) entre 15 et 30 champs sont sélectionnés et chaque champ est pris en photo 220 fois à 5 minutes d'intervalle à l'aide d'un objectif x20 à air. Au total, cela correspond à une acquisition de 18 heures et 30 minutes. Le contraste et la focalisation sont réglés avant l'enregistrement de telle sorte à ce que les contours des cellules soient suffisamment apparents. Les vidéos obtenues sont ensuite analysées à l'aide du logiciel Image J. Le premier plugin d'Image J utilisé est appelé « Cell counter notice ». Il permet de compter le nombre de cellules par champ au début et à la fin de la vidéo. En divisant le nombre final de cellules sur le nombre initial dans chaque champ (Figure 69), on peut en déduire le facteur de prolifération.

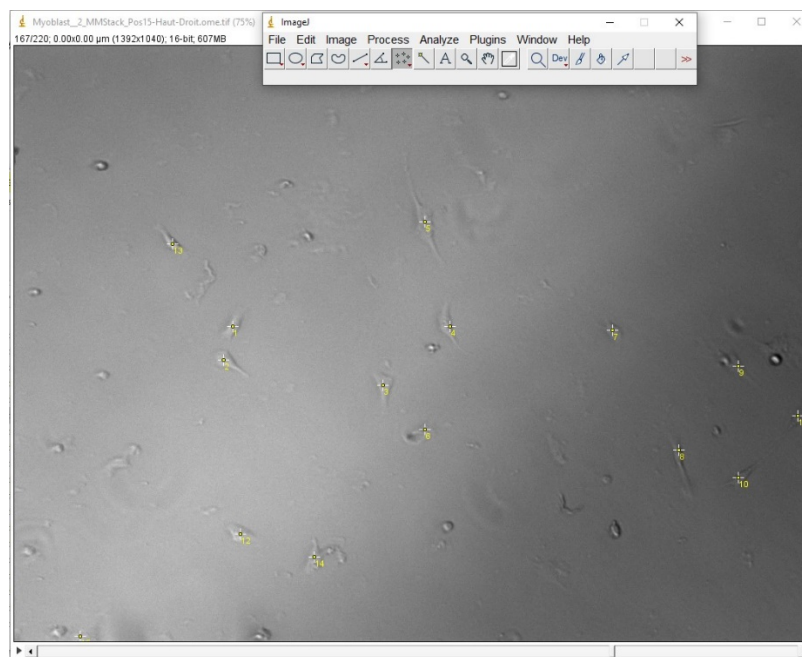


Figure 69 : Aperçu de l'interface ImageJ du plugin de « Cell counter notice ». Les croix jaunes permettent de marquer les cellules déjà comptées.

Le deuxième plugin utilisé est appelé « manual tracking ». Il permet de repérer et de suivre la position d'une cellule sur les 220 images définies au centre de la cellule. Ces coordonnées permettent d'en déduire la trajectoire du centre de la cellule pendant le temps de l'acquisition. Les paramètres d'analyse indiqués dans Image J sont l'intervalle de temps entre chaque image,

fixé à 5 min, et la taille du pixel « (x,y) calibration » fixée à 0.65  $\mu\text{m}$ . Chaque trajectoire obtenue est traitée à l'aide d'un programme Matlab<sup>®</sup> développé spécifiquement au laboratoire. Il permet de tracer les trajectoires, de calculer les vitesses moyennes de migration des cellules, ainsi que le temps de persistance et le coefficient de diffusion. Notons que si une cellule est amenée à se diviser au cours des acquisitions vidéo, les 3 paramètres énumérés précédemment ne sont évalués que sur l'intervalle de temps entre les 2 divisions si la cellule se divise 2 fois, ou sur l'intervalle de temps entre la première division et la fin de l'acquisition.

### 3.9.1. *Représentation des trajectoires*

Dans un premier temps, nous avons cherché à représenter sur un même graphe, toutes les trajectoires d'une même condition, à savoir l'âge et le phénotype du rat dont sont issus les myoblastes. Pour ce faire, le premier point de chaque trajectoire est déplacé au centre du graphe au point de coordonnées (0,0). Le coefficient de translation qui a servi à ce déplacement est donc déterminé et appliqué à l'ensemble des points de la trajectoire. Toutes les trajectoires d'une même condition peuvent être ainsi reportées et superposées sur un même graphe où chaque couleur correspond à la trajectoire d'une même cellule (Figure 70).

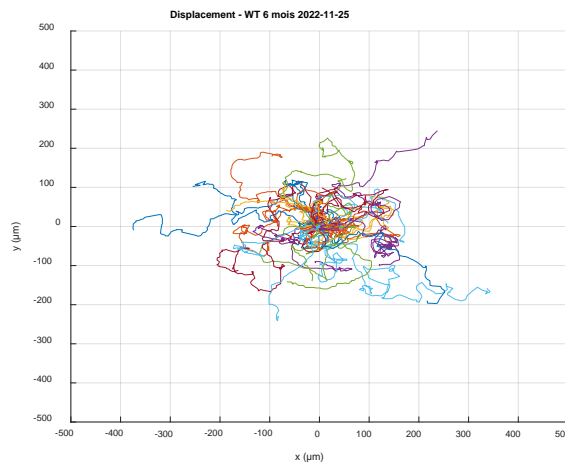


Figure 70 : Schéma de la trajectoire de myoblastes issus d'un rat WT âgé de 6 mois.

### 3.9.2. *Calcul des vitesses moyennes :*

A partir des coordonnées de chaque point de la trajectoire, il est aisé de calculer la vitesse moyenne d'une cellule via la relation suivante :

$$\bar{v} = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N \frac{[(x_{i+1} - x_i)^2 + (y_{i+1} - y_i)^2]^{1/2}}{\Delta t} \quad (24)$$



Où N est le nombre total de positions occupées par une cellule au cours d'une acquisition en vidéo-microscopie,  $(x_i, y_i)$  sont les coordonnées de chaque position aux temps  $t_i$ , et  $\Delta t$  est l'intervalle de temps entre deux positions successives avec ici  $\Delta t = 5 \text{ min}$ .

- Calcul de la MSD et détermination des paramètres P et D

Pour décrire le comportement migratoire des myoblastes, nous avons cherché à déterminer des paramètres caractéristiques. Une façon de faire consiste à calculer le déplacement quadratique moyen ou MSD (pour Mean Square Displacement) qui permet de distinguer un mouvement dirigé persistante d'un mouvement diffusif. La MSD est défini suivant la relation (25) :

$$MSD(n\Delta t) = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-1-n} [(x_{i+n} - x_i)^2 + (y_{i+n} - y_i)^2]^{1/2} \quad (25)$$

Où N est le nombre total de positions occupées par une cellule au cours d'une acquisition en vidéo microscopie,  $(x_i, y_i)$  sont les coordonnées de chaque position i aux temps  $t_i$ , et  $\Delta t$  est l'intervalle de temps entre deux positions successives avec ici  $\Delta t = 5 \text{ min}$ , et  $n\Delta t$  est la taille de la fenêtre.

Par ailleurs, il est bien admis que la migration cellulaire peut être modélisée par un modèle de marche aléatoire de persistance comme celui proposé par (Ornstein, 1919) (Uhlenbeck et al., 1930)). Ainsi, la MSD est déterminée en appliquant ce modèle suivant l'équation ci-dessous :

$$MSD(t) = 2n_d D \left( t - P \left( 1 - e^{-t/P} \right) \right) \quad (26)$$

Où D est le coefficient de diffusion ou encore coefficient de mobilité, il quantifie la capacité des cellules à se diffuser pendant la migration. C'est un coefficient qui caractérise la composante stochastique du mouvement cellulaire qui permet aux cellules d'explorer leur environnement local. Son unité est une unité de longueur au carré, divisée par une unité de temps (par exemple,  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  ou  $\text{cm}^2/\text{s}$ ).

P est le temps de persistance du mouvement qui désigne une mesure de la persistance directionnelle ou de la rectitude du mouvement cellulaire pendant la migration. Il quantifie comment les cellules maintiennent leur trajectoire de migration au fil du temps. Il est donné en minutes dans notre étude.

$n_d$  la dimension de l'environnement de la cellule (ici 2).

Notons que pour les temps courts ( $t \ll P$ ), on a que :

$$\lim_{t/P \rightarrow 0} MSD = n_d D \frac{t^2}{P} \quad (27)$$

Avec  $v = \sqrt{\frac{n_d D}{P}}$ . On trouve ainsi un  $MSD = v^2 t^2$  qui est caractéristique d'un mouvement dirigé.

Aux temps longs ( $t \gg P$ ), on a que :

$$\lim_{t/P \rightarrow \infty} MSD = 2n_d D t \quad (28)$$

Qui est caractéristique d'un mouvement diffusif.

Concrètement, notre programme Matlab<sup>®</sup> ajuste, par minimisation, la courbe théorique issue de l'équation (26) à la courbe expérimentale obtenue via l'équation (27) pour déterminer les coefficients D et P.

### 3.10. Tests statistiques :

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism (GraphPad). Des comparaisons multiples ont été effectuées lorsque les conditions expérimentales étaient similaires. Pour l'analyse statistique des données, nous avons vérifié d'une part, la normalité et d'autre part, l'égalité des variances. Il s'est avéré que, dans la plupart des cas, ces conditions n'étaient pas validées. Ceci nous a conduit à utiliser principalement des tests ANOVA non-paramétriques à sens unique (Kruskal-Wallis).

Pour la comparaison stricte entre deux conditions, nous avons utilisé le test t bilatéral non apparié non-paramétrique de Mann-Whitney pour les mêmes raisons que celles citées précédemment, à savoir l'absence de validité de l'hypothèse de normalité et d'égalité des variances.

Les valeurs « p » sont indiquées par '\*'  $p < 0.05$ , '\*\*'  $p < 0.01$  ; '\*\*\*'  $p < 0.001$  ; '\*\*\*\*'  $p < 0.0001$ . Les résultats sont considérés comme statistiquement significativement différents lorsque  $p < 0.05$ .

# Résultats

Le chapitre résultat de ce manuscrit présente l'étude multi-échelle et temporelle des propriétés mécaniques et biologiques du muscle issu de rats sain et malade. Il est divisé en deux parties distinctes. La première porte sur les résultats mécaniques et la deuxième sur les résultats biologiques.

Les résultats de la première partie sont organisés en fonction de l'échelle biologique de l'échantillon, à savoir l'échelle du myoblaste, du myotube, de la fibre musculaire et du muscle successivement pour les mesures de rigidité et l'échelle du myoblaste, du myotube, et de la fibre musculaire successivement pour les mesures de viscosité. Pour chaque échelle biologique, les mesures de rigidité sont présentées pour 3 points temporels différents à savoir à 1 mois, 6 mois et 10 mois et celles de viscosité pour 2 points temporels à 1 mois et 6 mois.

Plus spécifiquement, la rigidité a été mesurée par AFM à l'échelle du myoblaste, du myotube et de la fibre musculaire, et par élastographie ultrasonore à l'échelle musculaire. Cette rigidité est quantifiée au travers des valeurs du module d'élasticité (module d'Young) en kPa.

Concernant les propriétés viscoélastiques, les mesures ont été effectuées à l'aide d'un test de relaxation par AFM. Les résultats sont présentés sous la forme d'un tableau de valeurs moyennes des propriétés élastiques et viscoélastiques obtenues à partir du modèle de Maxwell-Wiechert généralisé du second ordre ainsi que sous la forme de graphiques donnant les contraintes normalisées tracées en fonction du temps.

Les résultats exposés dans la deuxième partie sont relatifs à des analyses de la prolifération, de la migration, de la structure, et de l'expression de gènes des myoblastes.

L'analyse de l'expression des gènes a pour objectif premier d'identifier les gènes, en lien avec le cytosquelette, qui seraient soit surexprimés soit sous-exprimés entre les myoblastes de rats WT et DMD âgés de 12 mois, afin de suggérer des voies de signalisation qui pourraient être perturbées ou anormalement activées dans les myoblastes DMD.

Ensuite, nous avons étudié deux des fonctions principales des myoblastes qui sont étroitement liées à la mécanique et à la structure du cytosquelette, à savoir la prolifération et la migration. La prolifération a été quantifiée en déterminant un facteur de prolifération et la migration en évaluant la vitesse de migration, le temps de persistance et le coefficient de diffusion. A cette caractérisation de fonction cellulaire est associée une étude sur la structure des myoblastes au travers de paramètres géométriques (hauteur et surface de la cellule) et d'expression de protéines en lien avec le cytosquelette (paxilline et actine).

Enfin, une étude complémentaire a été initiée pour quantifier la présence de desmine dans le muscle EDL (Extensor Digitorum Longus) par Western Blot. Des résultats préliminaires obtenus à partir d'échantillons de rats âgés de 6 mois sont également présentés.

De façon plus générale, les évolutions des paramètres évaluées (rigidité, vitesse de migration, coefficient de diffusion, le temps de persistance, facteur de prolifération, surface et hauteur des cellules, nombre de site d'adhérence de paxilline, et taux d'actine) sont représentées sous forme d'histogrammes, avec sur l'axe des ordonnées la grandeur mesurée et sur l'axe des abscisses les différents groupes de rats utilisés. Pour chaque paramètre testé, nous avons choisi de montrer deux types de représentations des données différentes. Dans le premier cas, chaque point correspond soit à la valeur du paramètre évaluée pour une cellule (exemple surface d'une cellule) soit à la valeur modale des mesures pour une cellule (exemple, rigidité d'une cellule évaluée à partir d'une carte des rigidités mesurée par AFM), avec une moyenne de 10 cellules par rat et un minimum de trois rats ( $n = 3$ ) pour la plupart des mesures. Cette représentation, qui ne sera pas commentée dans ce manuscrit, permet de montrer la dispersion des mesures sur l'ensemble des cellules et entre les rats, et de donner un aperçu des résultats. Dans le deuxième cas, chaque point représente la valeur moyenne de l'ensemble des mesures pour un rat. En complément de chaque histogramme, un tableau de valeurs quantifiées pour chaque groupe de rats donne accès au nombre de cellules mesurées/analysées, valeurs maximales et minimales, moyenne, écart type et erreur type de la moyenne des grandeurs mesurées.

## 1. Etude mécanique multi-échelle

### 1.1. Echelle du myoblaste :

#### 1.1.1. *Evaluation du module d'élasticité en fonction de l'âge :*

La rigidité des myoblastes issus de rats WT et DMD a été évaluée par AFM en fonction de l'âge. Les nombres de cellules et de rats ainsi que les résultats des mesures sont présentés dans le Tableau 2 et représentés sous forme d'histogramme dans les Figure 71 et Figure 72.

Tableau 2 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la rigidité des myoblastes.

Type et âges de rats (mois)	WT-1	DMD-1	WT-6	DMD-6	WT-10	DMD-10
Nombre de rat	5	6	3	5	3	3
Nombre de cellules	56	54	29	51	28	30
Minimum (kPa)	0.9400	2.650	2.360	1.050	2.080	1.510
Maximum (kPa)	14.28	11.13	14.89	11.87	8.750	4.780

Moyenne (kPa)	5.241	6.346	6.352	4.405	3.918	3.173
Ecart-type (kPa)	2.579	1.783	3.138	2.380	1.605	0.8983
Erreur type de la moyenne (kPa)	0.3446	0.2426	0.5827	0.3333	0.3033	0.1640

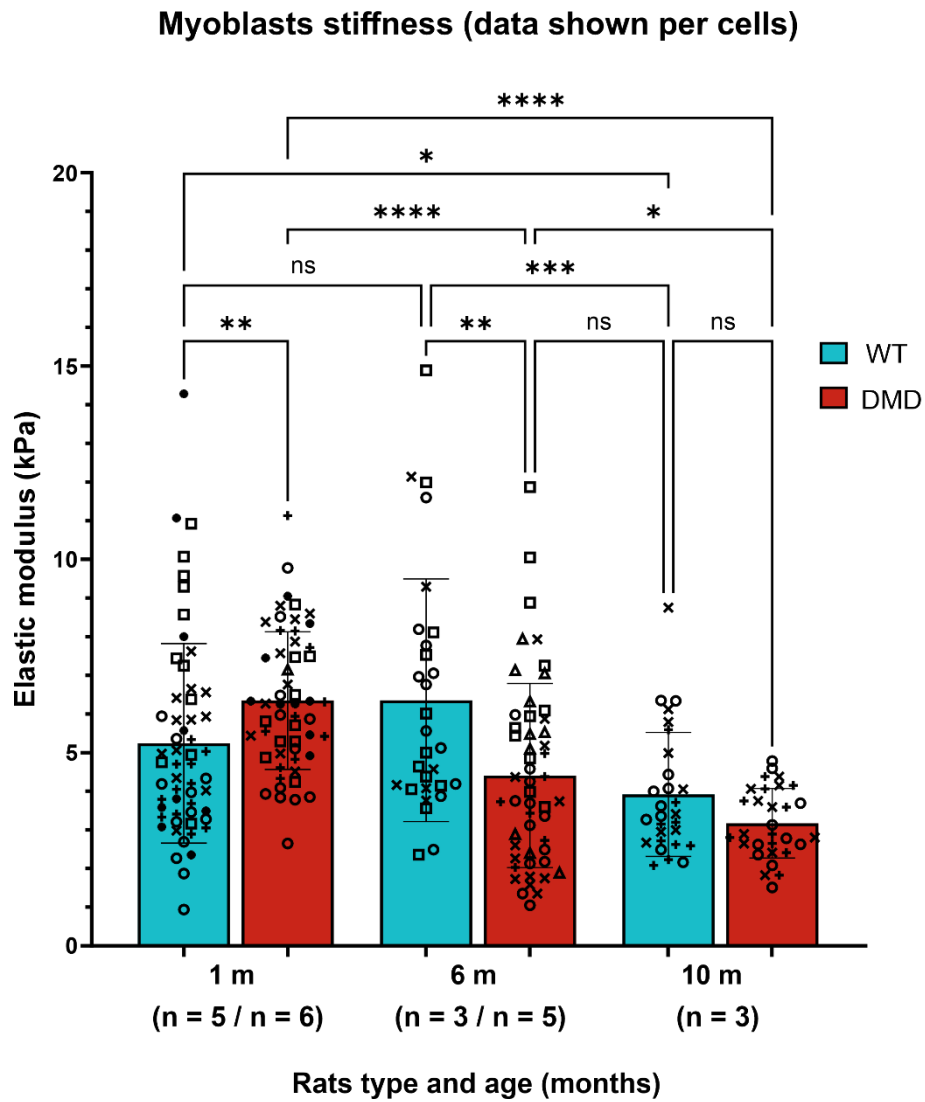


Figure 71 : Histogramme montrant les valeurs moyennes des rigidités des myoblastes par cellule pour des rats WT et DMD suivant l'âge (mois). Chaque symbole représente un rat. Le nombre de n indique le nombre de rats évalués.

## Myoblasts stiffness

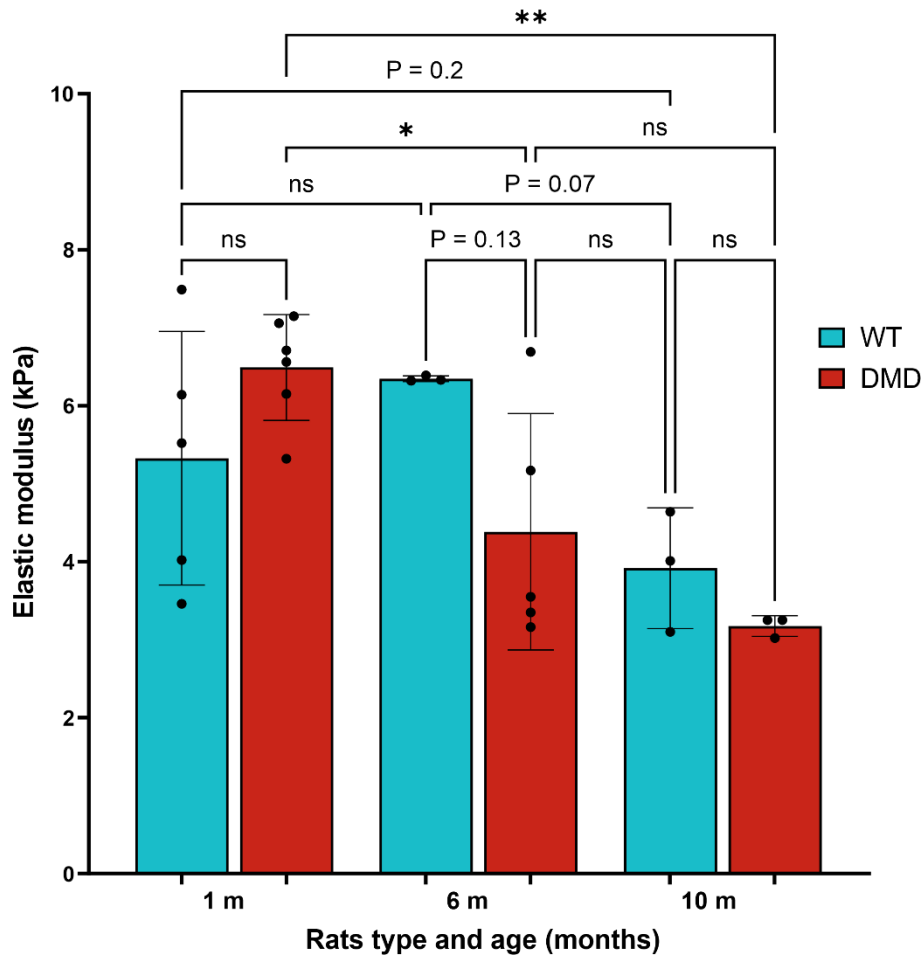


Figure 72 : Histogramme montrant les valeurs moyennes des rigidités des myoblastes par rat WT et DMD en fonction de l'âge des rats (en mois).

En analysant la Figure 72, nous constatons que la rigidité musculaire ne présente pas de différence majeure entre les rats WT d'1 mois et ceux de 6 mois. Cependant, nous observons une diminution de 38% de la rigidité chez les rats WT de 10 mois. Bien que la diminution de la rigidité à 10 mois ne soit pas statistiquement significative ( $p = 0.07$ ), il semble y avoir une tendance claire à la baisse à cet âge, ce que l'on observe également à la Figure 71.

En ce qui concerne les rats DMD, il y a une diminution significative de la rigidité des myoblastes en fonction de l'âge et donc de l'évolution de la pathologie. Les résultats indiquent une différence significative de 31% entre les modules de Young des myoblastes d'1 mois et de 6 mois (\*), ainsi qu'une différence non significative de 28% entre 6 mois et 10 mois ( $p = 0.21$ ). En conséquence, on observe une diminution de la rigidité très significative de 50% entre 1 mois et 10 mois (\*\*). Ces résultats soulignent une évolution notable de la rigidité musculaire chez les rats DMD au fur et à mesure qu'ils vieillissent. Les différences significatives observées entre

les groupes d'âge indiquent une détérioration progressive de la rigidité des myoblastes chez les rats DMD. La diminution marquée de 50% entre 1 mois et 10 mois met en évidence l'impact significatif de l'âge et de l'évolution de la pathologie sur la rigidité musculaire chez les rats DMD.

En comparant les myoblastes WT et DMD (Figure 72), nous observons qu'à l'âge de 1 mois, il n'y a pas de différence de rigidité entre les myoblastes DMD et WT. Cependant, cette équivalence change au fil du temps, car à l'âge de 6 mois, les myoblastes DMD deviennent moins rigides que les WT, avec une diminution de 31% ( $p = 0.13$ ). Cette différence non-significative se réduit à l'âge de 10 mois, où les myoblastes DMD sont moins rigides que les WT avec une différence de 20%.

Il est également important de noter qu'il n'y a pas de différence de rigidité entre les myoblastes DMD âgés de 6 mois et les myoblastes WT âgés de 10 mois. Cela peut suggérer que les myoblastes DMD présentent une diminution prématurée de leur rigidité par rapport aux myoblastes WT. La diminution de la rigidité à un stade plus précoce (6 mois) chez les myoblastes DMD par rapport aux myoblastes WT suggère une progression accélérée des changements structurels chez les rats atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne.

### 1.1.2. *Evaluation des propriétés viscoélastiques en fonction de l'âge :*

La viscosité des myoblastes issus de rats WT et DMD a été évaluée par AFM en fonction de l'âge (1 mois et 6 mois). Le nombre de rats utilisés dans cette étude est de ( $n = 3$ ) pour les myoblastes issus de rats d'1 mois et ( $n = 2$ ) pour les myoblastes issus de rats de 6 mois. Les résultats des mesures sont reportés dans le Tableau 3 et les courbes de relaxation sont montrées dans la Figure 73.

Tableau 3 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la viscosité des myoblastes.

	$E_{\infty}$ (kPa)	$E_1$ (kPa)	$E_2$ (kPa)	$\eta_1$ (kPa.s)	$\eta_2$ (kPa.s)	$\tau_1$ (s)	$\tau_2$ (s)
WT – 1 mois	12.64 ± 9.31	7.29 ± 4.54	6.22 ± 3.78	0.50 ± 0.29	4.28 ± 2.44	0.07 ± 0.01	0.73 ± 0.18
DMD – 1 mois	8.45 ± 4.16	5.53 ± 2.68	4.61 ± 2.23	0.39 ± 0.16	3.66 ± 1.57	0.08 ± 0.02	0.85 ± 0.26
WT – 6 mois	12.21 ± 5.27	3.85 ± 1.48	4.09 ± 1.77	0.31 ± 0.11	3.56 ± 2.01	0.08 ± 0.01	0.88 ± 0.19
DMD – 6 mois	10.43 ± 7.49	4.91 ± 2.99	4.76 ± 2.86	0.34 ± 0.21	3.62 ± 2.67	0.07 ± 0.01	0.73 ± 0.13



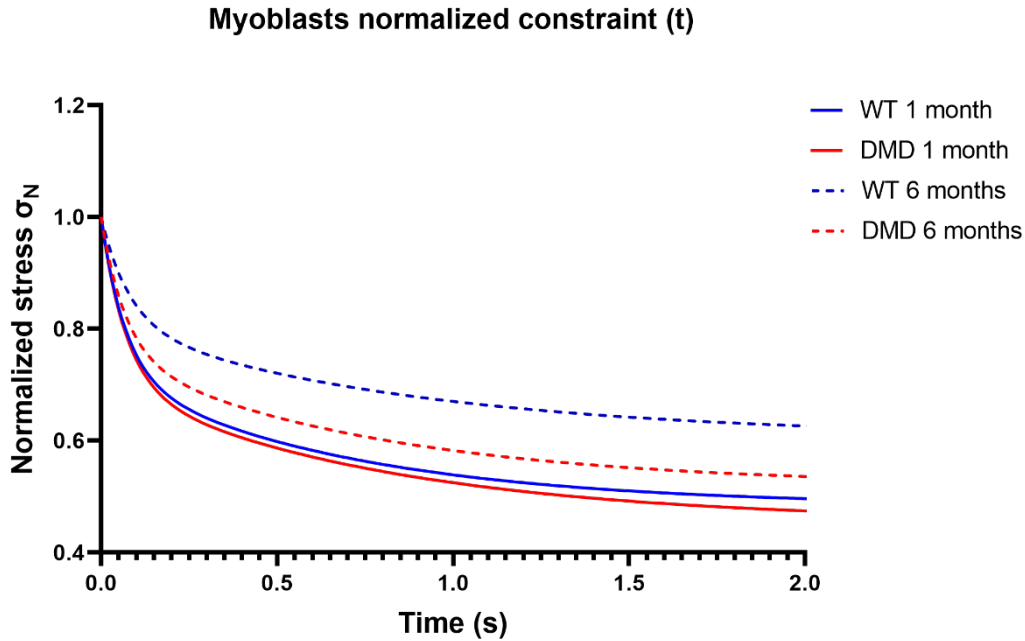


Figure 73 : Courbes de relaxation montrant l'évolution des contraintes normalisées en fonction du temps pour des myoblastes issus de rats WT et DMD âgés d'1 mois et de 6 mois.

Le graphique de l'évaluation des contraintes normalisées (Figure 73) révèle que, à 2 secondes, la contrainte est relaxée de 50% pour les myoblastes WT d'1 mois et de 37% pour les myoblastes WT de 6 mois. Pour les myoblastes DMD, la baisse de la contrainte est de 53% à 1 mois et de 47% à 6 mois. Ces résultats indiquent qu'à 1 mois, la relaxation de la contrainte à 2 secondes est pratiquement similaire entre les myoblastes WT et DMD, tandis qu'à 6 mois, la diminution de la contrainte est plus marquée pour les myoblastes DMD que pour les WT.

Cette observation suggère que les propriétés viscoélastiques des myoblastes DMD à 6 mois diffèrent de celles des myoblastes WT. Il semble que les myoblastes DMD présentent une viscosité apparente moins importante, c'est-à-dire qu'ils ont tendance à relaxer davantage la contrainte. Cela peut indiquer des altérations dans la structure et la fonction des composants viscoélastiques des cellules musculaires chez les rats DMD.

## 1.2. Echelle du myotube :

### 1.2.1. *Evaluation du module d'élasticité en fonction de l'âge :*

Dans cette section, nous présentons les résultats de l'évaluation de la rigidité des myotubes WT et DMD (Figure 75, Figure 76, et Tableau 4). Ces mesures ont été effectuées sur un nombre de rats WT et DMD différents selon l'âge :  $n = 3$  pour les rats d'1 mois,  $n = 5$  pour les rats de 6 mois, et  $n = 2$  pour les rats WT et  $n = 3$  pour les rats DMD de 10 mois. Il est important de noter qu'à l'âge de 10 mois, les myoblastes, en particulier les myoblastes DMD, rencontrent des

difficultés à fusionner pour former des myotubes (Figure 74). Ceci nous a conduit à choisir des myotubes ayant approximativement le même diamètre pour nos évaluations. Le diamètre a été évalué par observation sur les images prises en contraste de phase.

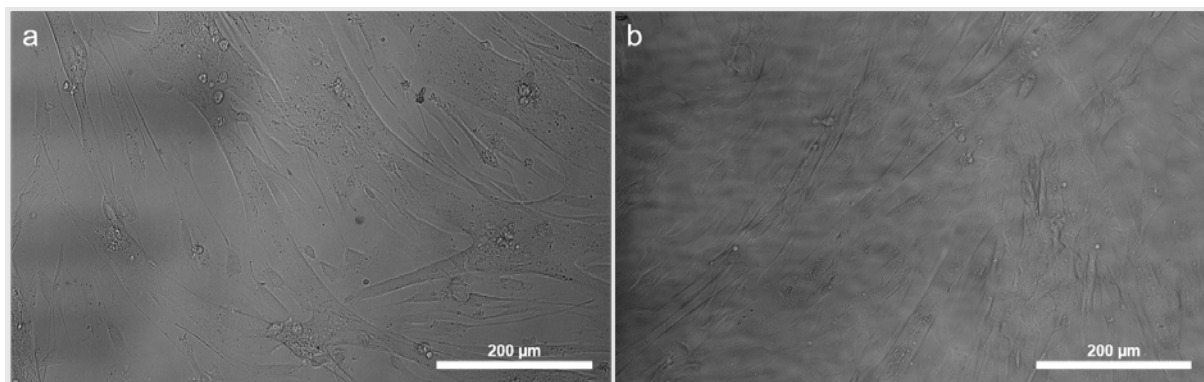


Figure 74 : Images en contraste de phase de myotubes. a : WT ; b : DMD.

Tableau 4 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la rigidité des myotubes.

Type et âges de rats (mois)	WT-1	DMD-1	WT-6	DMD-6	WT-10	DMD-10
Nombre de cellules	26	25	30	33	14	23
Minimum (kPa)	3.090	2.020	1.110	2.590	3.150	2.900
Maximum (kPa)	13.71	9.480	19.63	9.760	15.89	10.01
Moyenne (kPa)	6.647	5.218	9.838	6.111	7.481	6.053
Ecart-type (kPa)	2.467	2.295	4.040	2.050	3.917	2.129
Erreur type de la moyenne (kPa)	0.4838	0.4589	0.7376	0.3569	1.047	0.4440

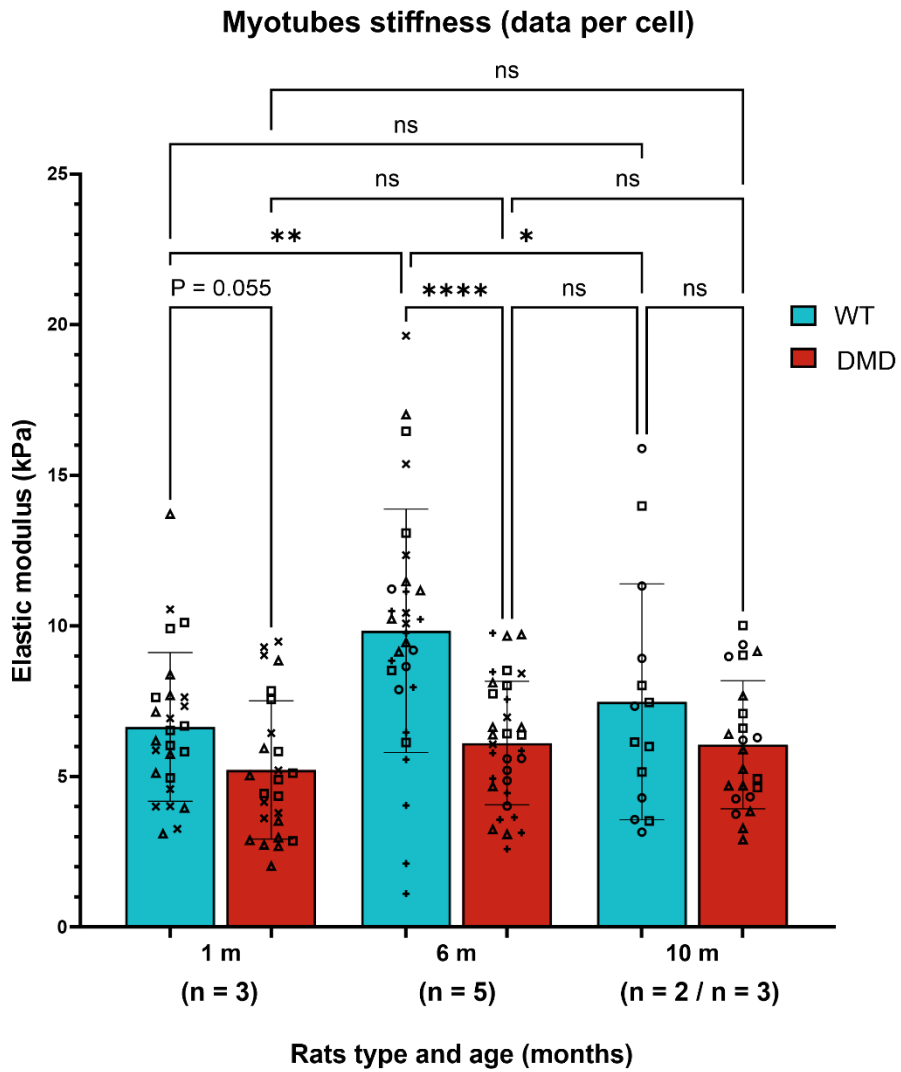


Figure 75 : Histogramme montrant les moyennes des rigidités des myotubes par cellule pour des rats WT et DMD suivant l'âge (mois). Sur le graphique chaque symbole représente un rat unique. Le nombre de n indique le nombre de rats évalués.

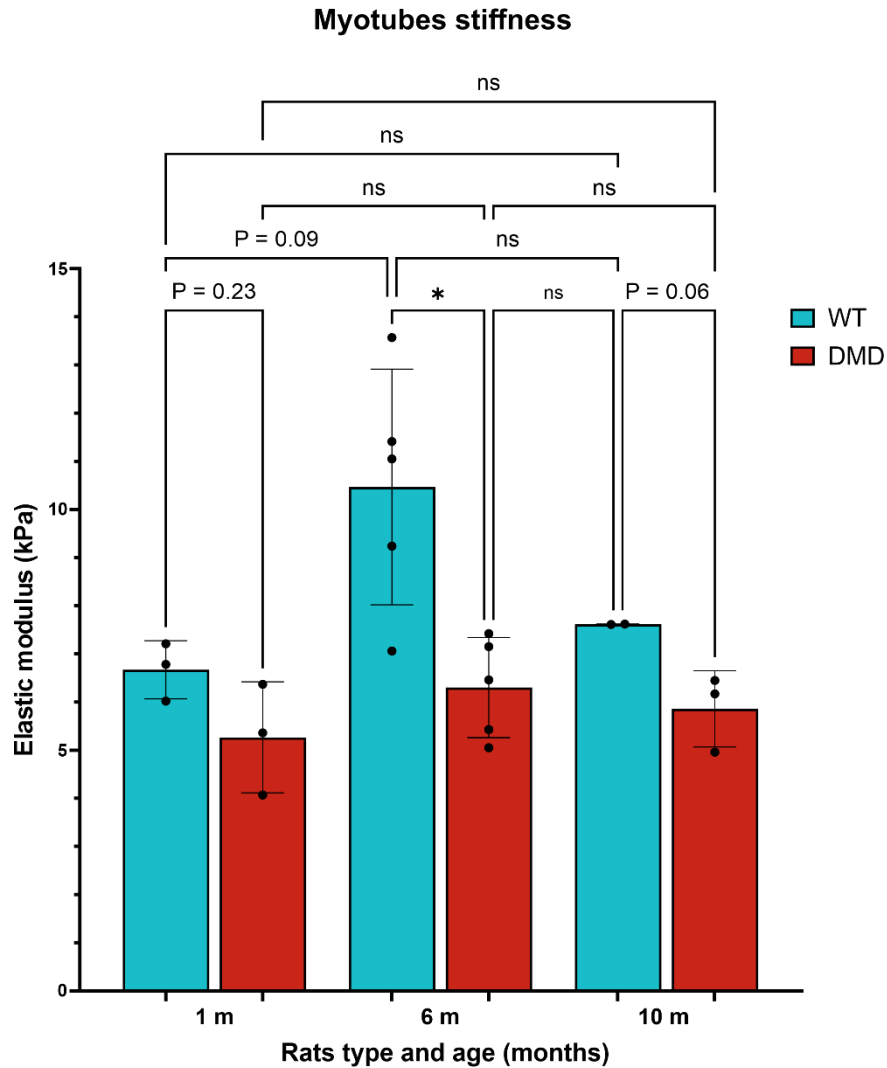


Figure 76 : Histogramme montrant les moyennes des rigidités des myotubes par rat WT et DMD suivant l'âge (mois).

Pour les myotubes WT, il est observé une augmentation importante de la rigidité à 6 mois, qui est cependant non significative (48%,  $p = 0.09$ ), suivie d'une diminution à 10 mois (24%). En moyenne, il y a donc peu de différence de rigidité entre 1 mois et 10 mois (13%).

En ce qui concerne les myotubes DMD, une légère augmentation de la rigidité est observée à 6 mois (17%), suivie d'une stabilité jusqu'à 10 mois. Il y a donc peu de changement de rigidité entre 1 mois et 10 mois (15%).

En comparant les myotubes WT et DMD (Figure 76), il est noté que, quel que soit l'âge des rats, les myotubes WT sont plus rigides que les myotubes DMD, même si cette différence est souvent non significative. La différence de rigidité est de 21.5% ( $p = 0.23$ ), 37% (\*) et 19% ( $p = 0.06$ ) à respectivement 1 mois, 6 mois et 10 mois.

Il est important de souligner qu'il n'y a pas de différence significative entre les myotubes DMD à 6 mois et les myotubes WT à 10 mois (22%).

Ces résultats mettent en évidence des différences de rigidité entre les myotubes WT et DMD à différents stades de développement. Les myotubes WT sont généralement plus rigides que les myotubes DMD, et cette différence persiste tout au long de la progression de l'âge.

Il convient de noter que la comparaison entre les myotubes DMD à 6 mois et les myotubes WT à 10 mois indique une similarité de rigidité, ce qui peut suggérer une avancée précoce de la dégradation de la structure des myotubes DMD par rapport aux myotubes WT.

### 1.2.2. *Evaluation du module d'élasticité en fonction de l'âge et de l'échelle biologique :*

De plus, il est important de noter que les résultats de rigidité entre les myoblastes et les myotubes suivent la même tendance à 6 mois et 10 mois, indiquant que les myotubes DMD sont moins rigides que les WT, tout comme les myoblastes qui les ont formés. Cette cohérence suggère que la diminution de rigidité observée chez les DMD se poursuit à l'échelle des myotubes, soulignant ainsi une altération généralisée des propriétés mécaniques dans la DMD.

Cependant, il convient de noter une inversion de cette tendance à 1 mois, où l'on observe que les myoblastes DMD sont légèrement plus rigides que les WT. Cela suggère que la rigidité des myotubes ne résulte pas uniquement de la somme des rigidités des myoblastes individuels, mais est également influencée par le processus de fusion et de remodelage du cytosquelette qui se produit lors de cette étape. Il est possible que ce processus soit différent à 1 mois en raison d'un phénotype dystrophique moins prononcé à cet âge.

### 1.2.3. *Evaluation des propriétés viscoélastiques en fonction de l'âge :*

Ici, nous présentons les résultats de l'évaluation des propriétés viscoélastiques des myotubes (Tableau 5) et les courbes de relaxation sont montrées dans la Figure 77. Le nombre de rats utilisés dans cette étude est de  $n = 3$  et  $n = 1$  pour les myotubes issus de rats d'1 mois et 6 mois respectivement.

Tableau 5 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la viscosité des myotubes.

	$E_{\infty}$ (kPa)	$E_1$ (kPa)	$E_2$ (kPa)	$\eta_1$ (kPa.s)	$\eta_2$ (kPa.s)	$\tau_1$ (s)	$\tau_2$ (s)
WT – 1 mois	48.39 ± 30.6	24.09 ± 14.5	25.07 ± 16.1	1.96 ± 1.2	22.75 ± 16.7	0.08 ± 0.01	0.85 ± 0.13
DMD – 1 mois	19.07 ± 8.3	11.09 ± 5.4	10.93 ± 5.1	0.85 ± 0.4	9.16 ± 4.4	0.08 ± 0.01	0.81 ± 0.16
WT – 6 mois	73.56 ± 37.2	35.13 ± 19.2	37.06 ± 18.3	2.86 ± 1.4	28.74 ± 11.7	0.08 ± 0.01	0.81 ± 0.10
DMD – 6 mois	23.49 ± 13.3	8.03 ± 3.8	9.16 ± 4.5	0.69 ± 0.4	8.42 ± 5.2	0,08 ± 0,01	0.87 ± 0.14

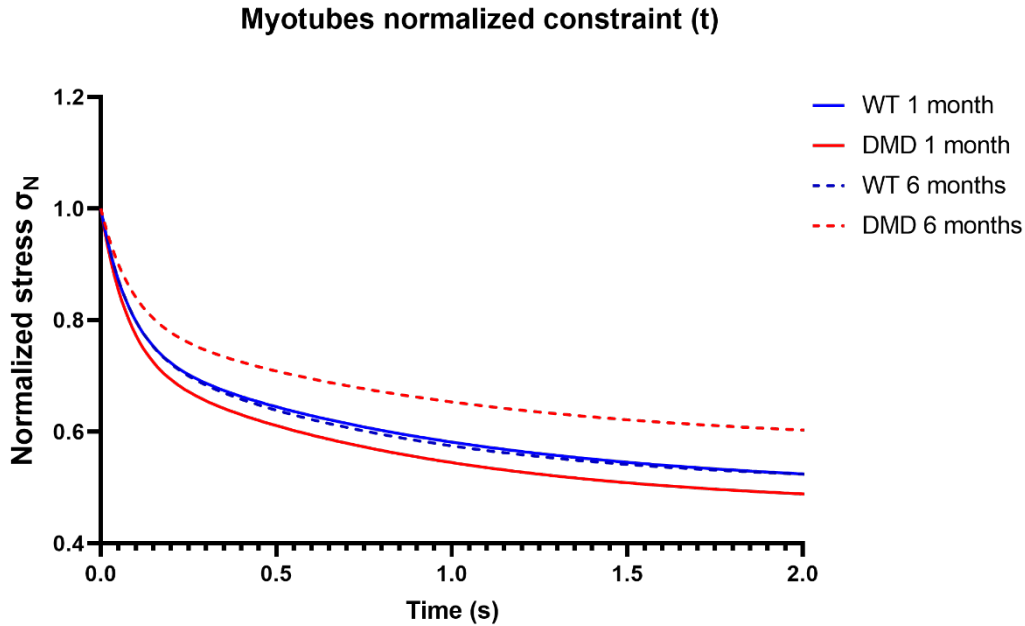


Figure 77 : Courbes de relaxation montrant l'évolution des contraintes normalisées en fonction du temps pour des myotubes issus de rats WT et DMD âgés d'1 mois et de 6 mois.

En analysant les contraintes normalisées des myotubes WT et DMD (Figure 77), nous observons que la relaxation de la contrainte à 2 s est similaire entre les myotubes WT d'1 mois et 6 mois, avec une diminution d'environ 47%. Cependant, pour les myotubes DMD d'1 mois, nous observons une baisse de la contrainte de 51.5%, ce qui n'est pas très différent de celle des WT d'1 mois. De manière surprenante, les myotubes DMD de 6 mois présentent une baisse de la contrainte d'environ 40% (47% pour les WT), ce qui suggère que ces myotubes ont des propriétés viscoélastiques qui relaxent moins la contrainte que pour les WT.

Il convient de noter que, dans le cas des myotubes WT et DMD de 6 mois, les mesures n'ont été effectuées que sur un seul échantillon, ce qui peut potentiellement altérer ou influencer les résultats. Il est important de prendre en compte cette limitation et de considérer ces résultats avec prudence.

### 1.3. Echelle de la fibre musculaire :

#### 1.3.1. *Evaluation du module d'élasticité en fonction de l'âge :*

Dans cette section, nous avons effectué des mesures de rigidité sur des fibres musculaires provenant de rats WT et DMD à différents stades de développement. Les données ont été obtenues à partir de 5 rats WT et 6 rats DMD d'1 mois, 3 rats (WT et DMD) de 6 mois et 2 rats (WT et DMD) de 10 mois. Au moins 2 fibres ont été isolées pour chaque rat, avec un minimum

de 8 acquisitions effectuées sur chaque fibre. Les résultats de ces mesures sont présentés dans le Tableau 6, ainsi que dans la Figure 78 et la Figure 79.

Tableau 6 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la rigidité des fibres musculaires.

Type et âges de rats (mois)	WT-1	DMD-1	WT-6	DMD-6	WT-10	DMD-10
Nombre de cellules	48	41	25	23	19	20
Minimum (kPa)	1.450	1.520	35.04	7.000	2.870	2.370
Maximum (kPa)	161.0	79.79	227.9	76.20	51.37	18.22
Moyenne (kPa)	48.49	23.36	125.4	32.95	20.91	7.746
Ecart-type (kPa)	43.88	20.11	57.56	21.29	14.31	3.882
Erreur type de la moyenne (kPa)	6.334	3.141	11.51	4.439	3.282	0.8680

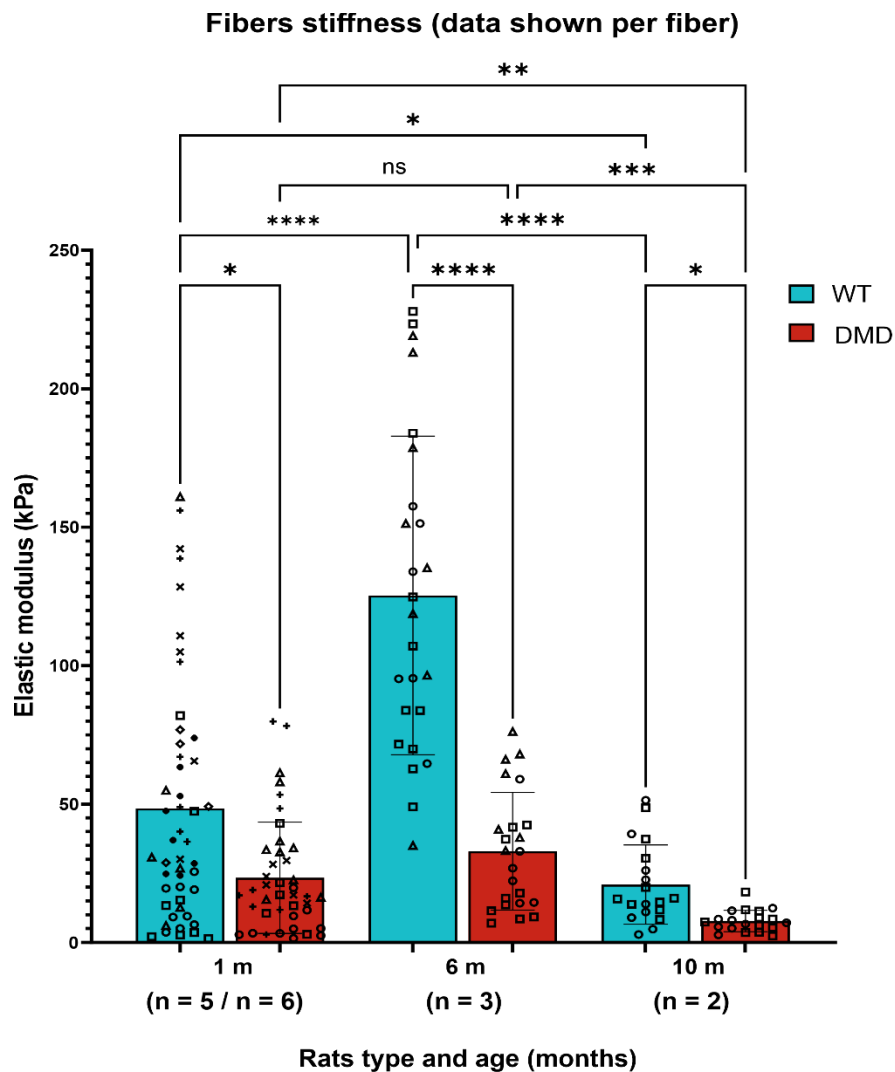


Figure 78 : Histogramme montrant les moyennes des rigidités des fibres par cellule pour des rats WT et DMD suivant l'âge (mois). Sur le graphique chaque symbole représente un rat unique. Le nombre de n indique le nombre de rats évalués.

## Fibers stiffness

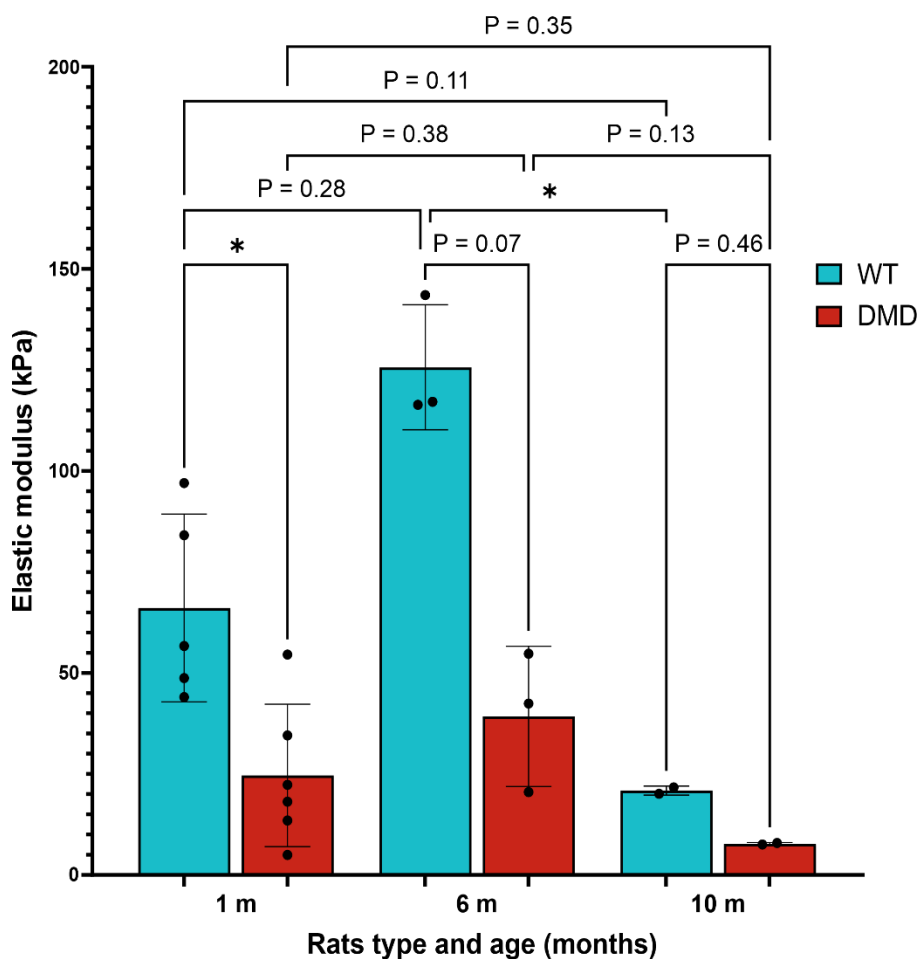


Figure 79 : Histogramme montrant les moyennes des rigidités des fibres par rat WT et DMD suivant l'âge (mois).

En examinant les histogrammes des mesures de rigidité des fibres WT, nous remarquons une tendance similaire à celle observée pour les myoblastes et les myotubes WT. En effet, nous observons une augmentation significative de la rigidité entre 1 mois et 6 mois, avec une augmentation de 159% (non significative), suivie d'une diminution de 83% (\*) à 10 mois.

Concernant les fibres DMD, nous observons une tendance similaire à celle des myotubes DMD, avec une légère augmentation de la rigidité à 6 mois (41%, non significatif), suivie d'une baisse de 76% (non significatif) à 10 mois. Cette tendance, à savoir une augmentation entre 1 mois et 6 mois, puis une baisse à 10 mois, observée pour les fibres DMD est identique à celle observée pour les fibres WT mais en moins prononcée.

En comparant les résultats des fibres WT et DMD, nous constatons que, tout comme pour les myotubes, les fibres WT sont plus rigides que les fibres DMD, quel que soit l'âge des rats. Cette



différence de rigidité est de 52% (\*), 74% (non significative) et 63% (non significative) pour les rats WT par rapport aux rats DMD d'1 mois, 6 mois et 10 mois respectivement.

### 1.3.2. *Evaluation des propriétés viscoélastiques :*

Nous avons également effectué une évaluation des propriétés viscoélastiques des fibres musculaires provenant des muscles EDL. Ces évaluations ont été réalisées sur des rats âgés de 1 mois et de 6 mois, à la fois pour les rats WT que pour les rats DMD. Dans le cas des fibres provenant de rats âgés de 1 mois, l'étude a été réalisée en utilisant un nombre total de 2 rats ( $n = 2$ ). Cependant, pour les fibres provenant de rats âgés de 6 mois, l'étude a été effectuée en utilisant un nombre total de 3 rats ( $n = 3$ ). Les résultats de ces évaluations sont présentés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la viscosité des fibres musculaires.

	$E_{\infty}$ (kPa)	$E_1$ (kPa)	$E_2$ (kPa)	$\eta_1$ (kPa.s)	$\eta_2$ (kPa.s)	$\tau_1$ (s)	$\tau_2$ (s)
WT – 1 mois	2299.1 ± 858	306.05 ± 145.3	406.7 ± 168.3	24.2 ± 14.7	341.5 ± 284.8	0.08 ± 0.02	0.73 ± 0.3
DMD – 6 mois	3362.7 ± 3429.8	424.64 ± 421.9	534.5 ± 451.6	38.38 ± 40	427.8 ± 396.9	0.08 ± 0.02	0.75 ± 0.24
WT – 6 mois	6831.8 ± 3914.6	761.7 ± 461	806.3 ± 528.4	68.1 ± 45.7	640.1 ± 503.1	0.09 ± 0.01	0.78 ± 0.2
DMD – 6 mois	1970.1 ± 1516.2	284.45 ± 199.6	316.4 ± 230.5	23.7 ± 16.3	263.2 ± 167.9	0.09 ± 0.01	0.86 ± 0.15

Les courbes de relaxation correspondantes sont présentées sur la Figure 80.

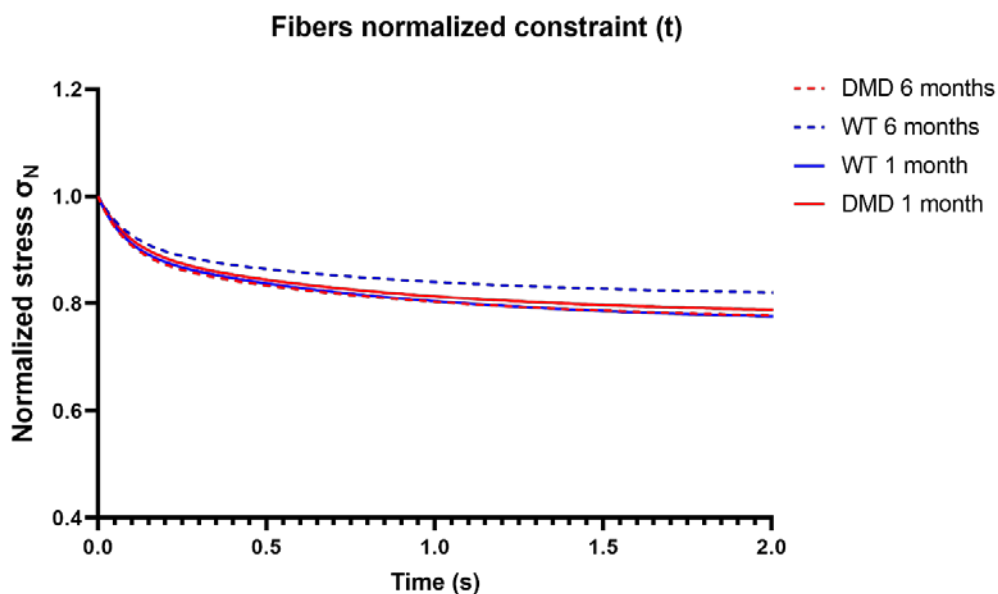


Figure 80 : Courbes de relaxation montrant l'évolution des contraintes normalisées en fonction du temps pour des fibres issues de muscles EDL de rats WT et DMD âgés d'1 mois et de 6 mois.

L'analyse du graphe des contraintes normalisées révèle que les propriétés visqueuses sont généralement similaires pour tous les modèles étudiés. Cependant, la relaxation de la contrainte à 2 secondes dans les fibres DMD de 6 mois (24%) est plus prononcée que celle observée dans les fibres WT (18%). Cela suggère qu'à cette échelle biologique, il existe une plus grande relaxation de la contrainte mécanique dans les fibres DMD.

#### 1.4. Echelle du muscle :

Comme décrit dans la section Matériel et méthodes, nous avons mesuré la rigidité du muscle TA chez les rats WT et DMD à différents âges et 3 positions différentes du pied. Les résultats de ces mesures sont présentés sous la forme d'histogrammes, qui représentent la moyenne des mesures effectuées. Chaque point de l'histogramme représente la moyenne de la rigidité d'un rat, basée sur les mesures de 2 muscles TA.

Les résultats affichent également l'écart-type correspondant pour chaque colonne de l'histogramme, ce qui permet d'évaluer la variabilité des mesures. De plus, la significativité des différences entre les colonnes est indiquée, permettant de déterminer les variations statistiquement significatives entre les groupes étudiés.

Au début de notre étude, en analysant les données recueillies sur les pattes de rats WT (n = 4) et DMD (n = 6) âgés de 10 mois, nous avons observé qu'il n'y avait pas de différence significative entre les moyennes des rigidités des pattes droites et des pattes gauches (ici chaque point représente la moyenne sur une patte de rat). Cela a été vérifié pour tous les types de rats et les différentes positions de mesure (J. E. Brandenburg et al., 2015) dont un exemple est présenté sur la Figure 81. Par conséquent, nous avons décidé de représenter l'ensemble de nos mesures en faisant une moyenne des pattes droites et gauches pour chaque rat.

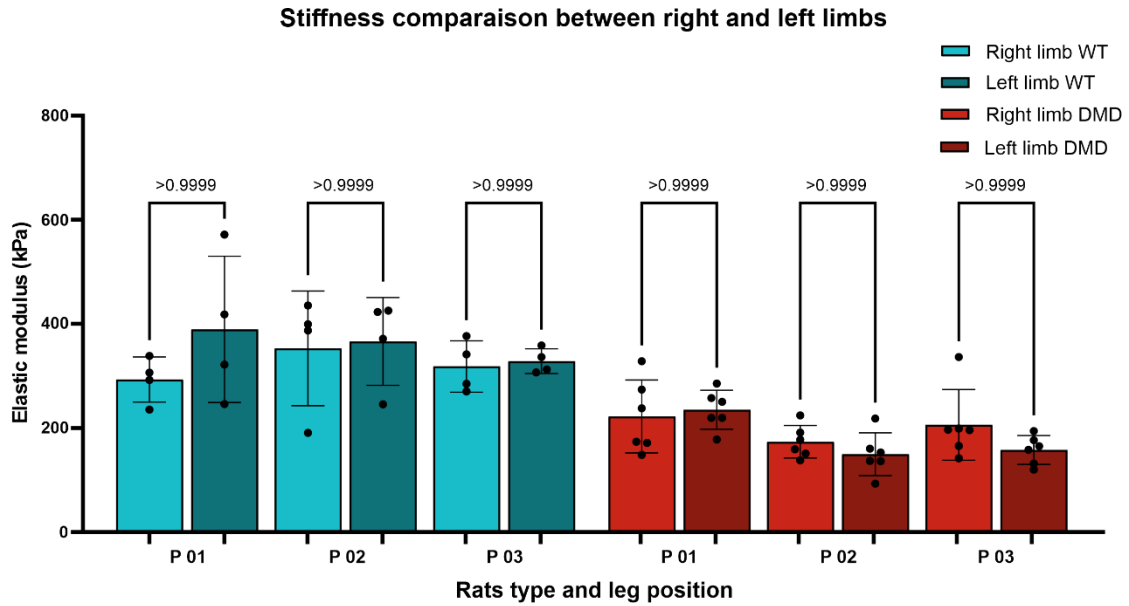


Figure 81 : Histogramme montrant la comparaison entre les moyennes des rigidités des pattes droites et gauches pour les rats WT et DMD âgés de 10 mois.

Ci-dessous, nous présentons les résultats de rigidité obtenus pour chaque position de pied en fonction du type de rats et leur âge (1 mois, 6 mois et 10 mois)

#### 1.4.1. *Position neutre (position 02) :*

Nous considérons la position neutre comme celle où le muscle est le moins sollicité. Cette position servira de référence pour la suite de notre analyse. L'ensemble des données quantitatives obtenu est présenté dans le Tableau 8, et les évolutions des rigidités sont affichées sous forme d'histogramme (Figure 82 et Figure 83).

Tableau 8: Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la rigidité des muscles en position neutre.

Type et âges de rats (mois)	WT-1	DMD-1	WT-6	DMD-6	WT-10	DMD-10
Nombre de pattes	4	6	8	5	6	12
Minimum (kPa)	287.4	301.5	107.3	179.0	379.5	126.8
Maximum (kPa)	292.6	396.3	172.2	334.3	430.5	187.7
Moyenne (kPa)	290.0	351.9	140.6	253.7	407.3	162.0
Ecart-type (kPa)	3.681	47.68	33.17	77.83	25.79	22.65
Erreur type de la moyenne (kPa)	2.603	27.53	16.58	44.94	14.89	9.247

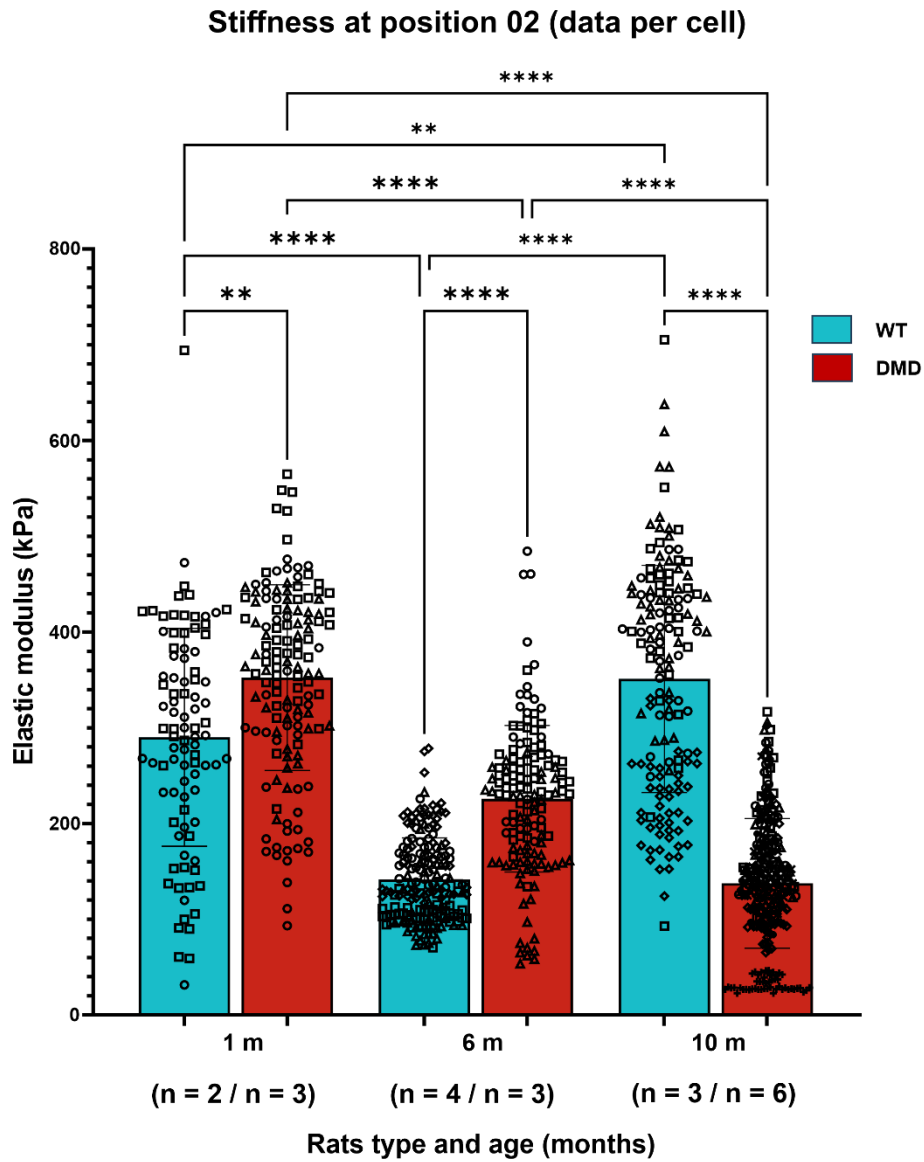


Figure 82 : Histogramme montrant les moyennes des rigidités des muscles TA en position neutre par rat WT et DMD suivant l'âge (mois). Sur le graphique chaque symbole représente un rat unique. Le nombre de n indique le nombre de rats évalués.

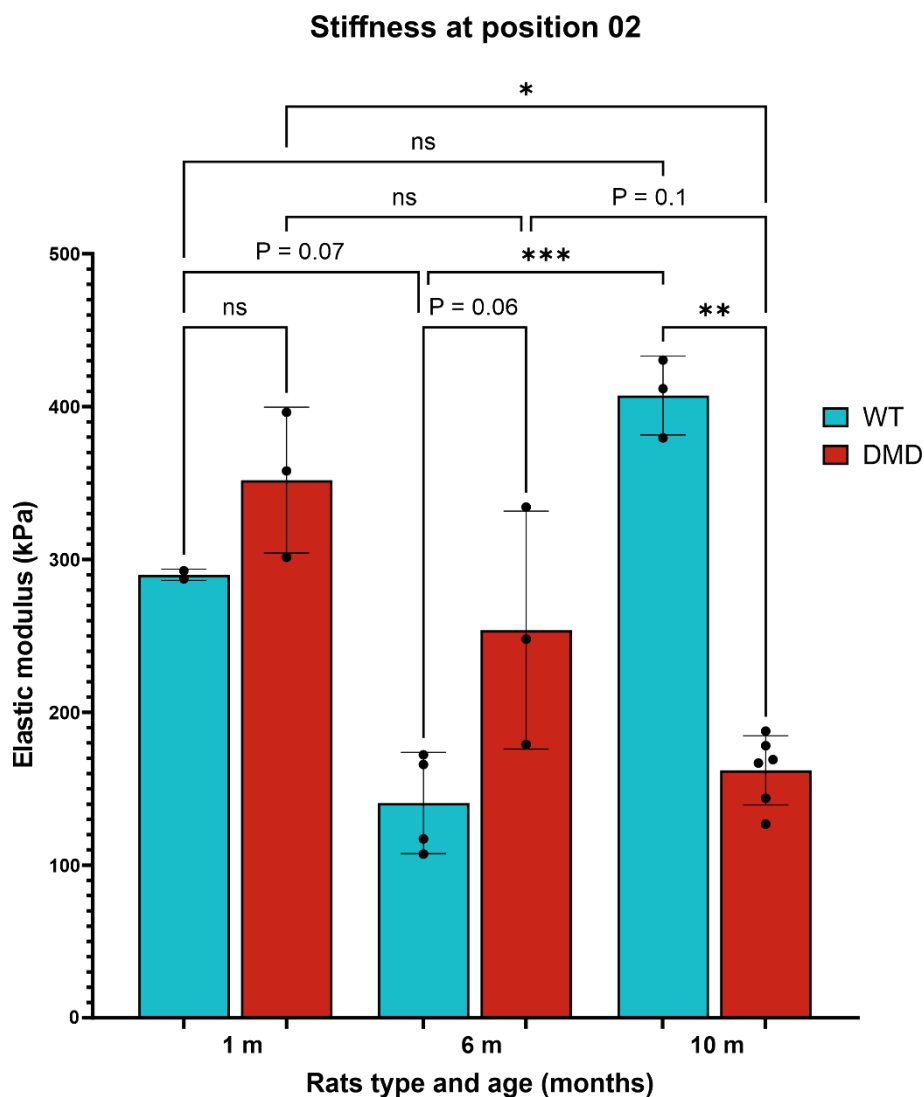


Figure 83 : Histogramme montrant les moyennes des rigidités des muscles TA en position neutre par rat WT et DMD suivant l'âge (mois).

Dans cette position (Figure 83), nous avons observé les tendances suivantes :

Pour les rats WT, nous avons constaté une diminution significative de la rigidité de 1 mois à 6 mois (52%,  $p = 0.07$ ). Cependant, de 6 mois à 10 mois, nous avons plutôt observé une augmentation significative de la rigidité (190%, \*\*\*). Il convient de noter qu'une augmentation de la rigidité avec l'âge a également été observée chez les personnes âgées (Eby et al., 2015). En résumé, chez les rats WT, la rigidité diminue puis augmente avec l'âge.

Pour les rats DMD, toujours dans la position neutre, nous avons remarqué une tendance à la baisse entre 1 mois et 6 mois (28%) et entre 6 mois et 10 mois (37%,  $p = 0.1$ ). Cette tendance est confirmée par une diminution significative de 54% entre 1 mois et 10 mois (\*).

En comparant les rats WT et DMD en fonction de l'âge (Figure 83), nous avons constaté qu'à 1 mois, il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes (21%,  $p = 0.57$ ), ce qui

confirme l'idée que nous sommes à un stade précoce de la pathologie. À 6 mois, la différence s'accroît entre les rats WT et DMD (80%,  $p = 0.06$ ), avec des muscles de rats DMD plus rigides que ceux des rats WT. À 10 mois, l'écart s'inverse entre les rats DMD et WT. Les muscles des rats DMD sont statistiquement moins rigides que les rats WT de 60% (\*\*), avec une diminution accrue de la rigidité des muscles chez les rats DMD en fin de vie.

#### 1.4.2. *Position de flexion plantaire (position 01) :*

Dans la position de flexion plantaire, il est supposé que le muscle TA soit légèrement étiré, tandis que le muscle gastrocnémien est plutôt contracté. Les résultats de rigidité pour cette position sont présentés dans le Tableau 9 et les Figure 84 Figure 85.

Tableau 9 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la rigidité des muscles en position de flexion plantaire.

Type et âges de rats (mois)	WT-1	DMD-1	WT-6	DMD-6	WT-10	DMD-10
Nombre de pattes	4	6	8	5	6	12
Minimum (kPa)	169.4	269.4	149.8	130.7	328.2	175.6
Maximum (kPa)	274.2	333.2	279.2	218.5	446.9	308.1
Moyenne (kPa)	221.8	292.3	209.8	177.4	377.3	229.3
Ecart-type (kPa)	74.08	35.54	56.07	44.14	61.92	49.56
Erreur type de la moyenne (kPa)	52.38	20.52	28.04	25.48	35.75	20.23

### Stiffness at position 01 (data per cell)

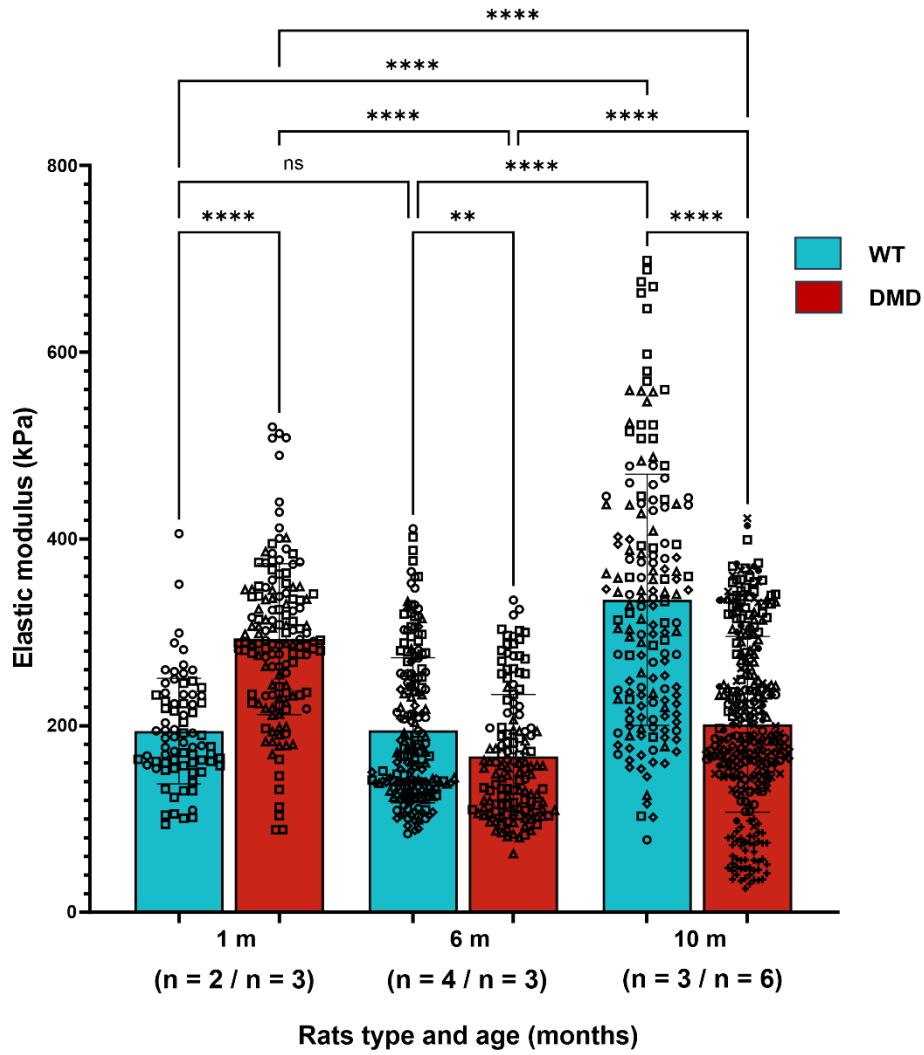


Figure 84 : Histogramme montrant les moyennes des rigidités des muscles TA en position de flexion plantaire par rat WT et DMD suivant l'âge (mois). Sur le graphique chaque symbole représente un rat unique. Le nombre de n indique le nombre de rats évalués.

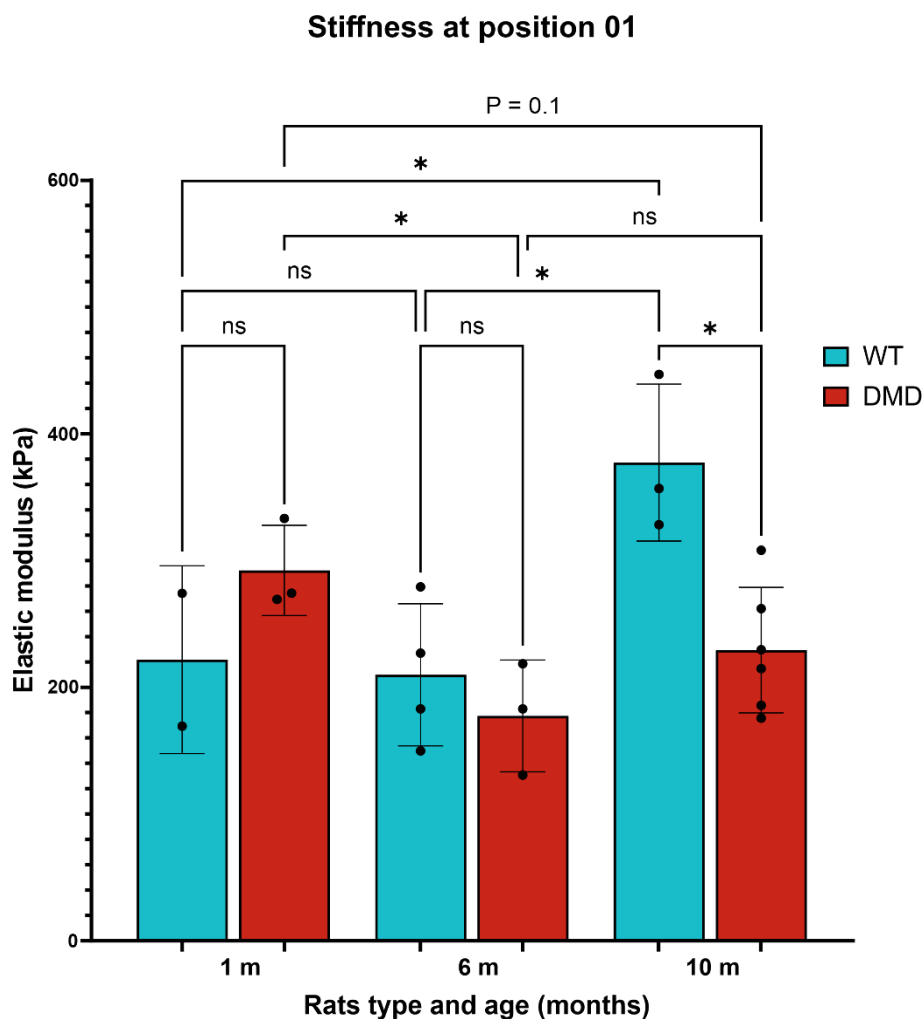


Figure 85 : Histogramme montrant les moyennes des rigidités des muscles TA en position de flexion plantaire par rat WT et DMD suivant l'âge (mois).

De l'analyse de la Figure 85 et du Tableau 9, nous pouvons observer les résultats suivants :

Pour les rats WT, il n'y a pas de différence significative entre 1 mois et 6 mois (5%,  $p = 0.8081$ ). Cependant, entre 6 mois et 10 mois, nous retrouvons une situation similaire à celle de la position neutre, avec une augmentation significative de la rigidité à 10 mois (80%, et \*). Cela entraîne une augmentation globale de la rigidité de 70% entre 1 mois et 10 mois.

En ce qui concerne les rats DMD, nous remarquons une diminution significative de 40% entre 1 mois et 6 mois (\*), suivie d'une légère augmentation de 30% entre 6 mois et 10 mois. Globalement, cela se traduit par une légère diminution des valeurs moyennes de 22% entre 1 mois et 10 mois ( $p = 0.1$ ), ce qui rejoint la diminution observée entre 1 mois et 10 mois à la position neutre.

Pour cette position, il n'y a pas de différence significative dans la rigidité entre les muscles WT et DMD à 1 mois et à 6 mois, même si la différence est de 31% et 15% respectivement.



Cependant, à 10 mois, nous observons que les rats DMD en fin de vie sont significativement moins rigides que les rats WT (40%, \*), ce qui confirme les résultats obtenus pour la position neutre.

#### 1.4.3. *Position de dorsiflexion (position 03) :*

En position de dorsiflexion (ou flexion dorsale), où le muscle TA est en extrême contraction, nous observons une tendance similaire à celle de la position neutre chez les rats WT, avec une augmentation de la rigidité moyenne de manière significative (Tableau 10, Figure 86, Figure 87). Ainsi, à 6 mois, la rigidité moyenne est réduite par rapport à 1 mois (66%, et \*\*). Ensuite, à 10 mois, nous observons une augmentation de la rigidité moyenne de 125% par rapport à 6 mois, avec une significativité de 2 étoiles (\*\*). La différence entre la position 03 (dorsiflexion) et la position neutre chez les rats WT est que la rigidité moyenne diminue légèrement entre 1 mois et 10 mois (25%), tandis qu'elle augmente nettement (40%) pour la position neutre.

Pour les rats DMD en dorsiflexion du muscle TA, nous observons une conservation de la rigidité moyenne entre 1 mois, 6 mois et 10 mois (11%, 21% et 30%) contrairement à la position neutre où il a été noté une diminution significative de la rigidité entre 1 mois et 10 mois (\*\*).

Dans la position dorsiflexion, nous constatons une différence faiblement significative entre les muscles WT et DMD à 1 mois, les muscles DMD étant moins rigides de 41.67% ( $p = 0.2$ ). Cette différence s'accroît mais s'inverse à 6 mois (55% et  $p = 0.07$ ). Enfin, à 10 mois, nous retrouvons une fois de plus le même résultat que pour la position neutre et la position 01, à savoir que les muscles WT sont plus rigides que les muscles DMD de 46% (\*).

Tableau 10 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la rigidité des muscles en position de dorsiflexion.

Type et âges de rats (mois)	WT-1	DMD-1	WT-6	DMD-6	WT-10	DMD-10
Nombre de pattes	4	6	8	5	6	12
Minimum (kPa)	410.1	188.7	129.0	194.1	321.9	130.8
Maximum (kPa)	477.0	363.1	183.8	275.0	354.6	256.6
Moyenne (kPa)	443.5	258.7	147.8	229.5	333.4	180.9
Ecart-type (kPa)	47.30	92.17	25.35	41.42	18.40	43.68
Erreur type de la moyenne (kPa)	33.45	53.21	12.68	23.92	10.62	17.83

### Stiffness at position 03 (data per cell)

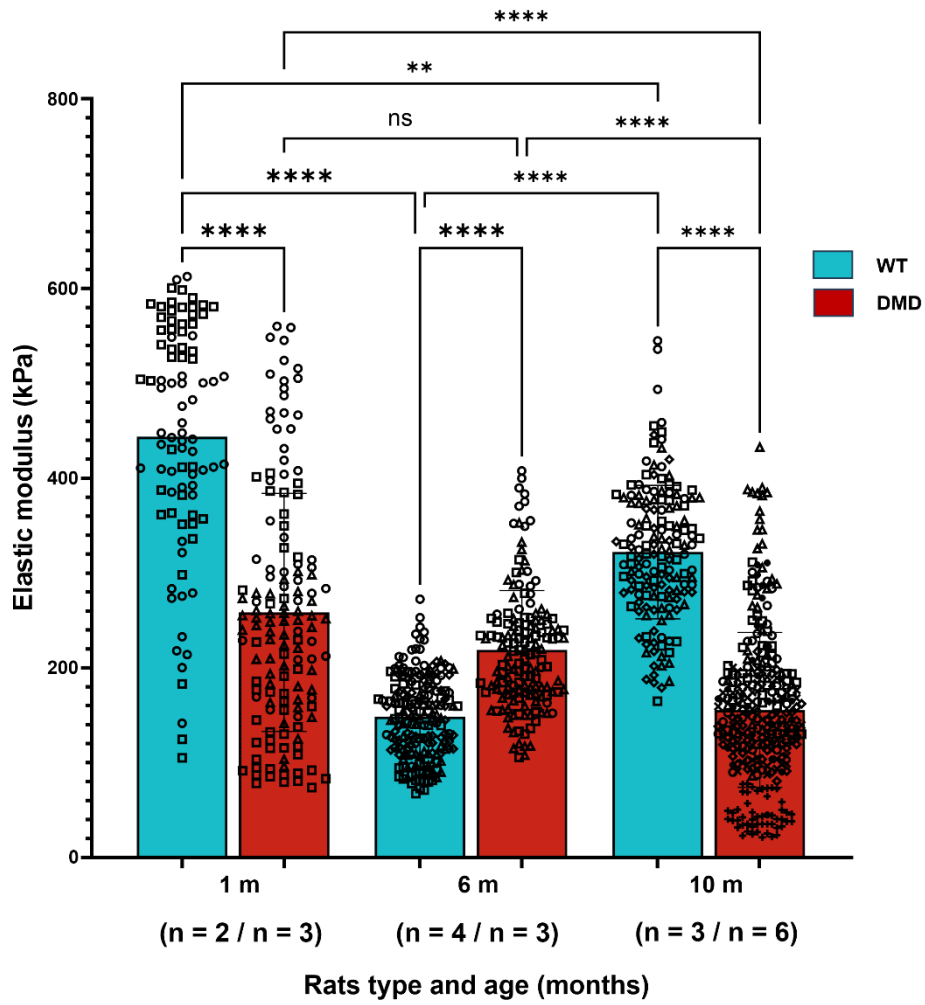


Figure 86 : Histogramme montrant les moyennes des rigidités des muscles TA en position de dorsiflexion par rat WT et DMD suivant l'âge (mois). Sur le graphique chaque symbole représente un rat unique. Le nombre de n indique le nombre de rats évalués.

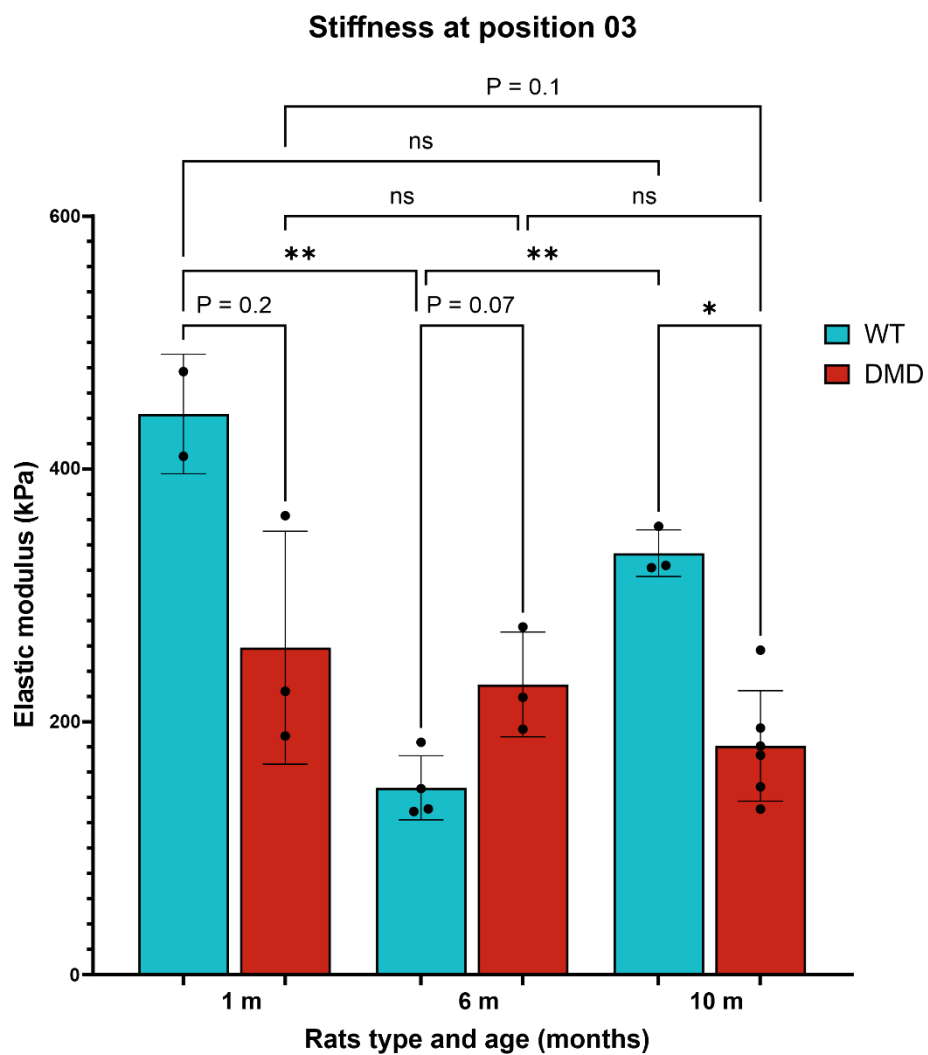


Figure 87 : Histogramme montrant les moyennes des rigidités des muscles TA en position de dorsiflexion par rat WT et DMD suivant l'âge (mois).

### Stiffness at all positions for 10 months rats

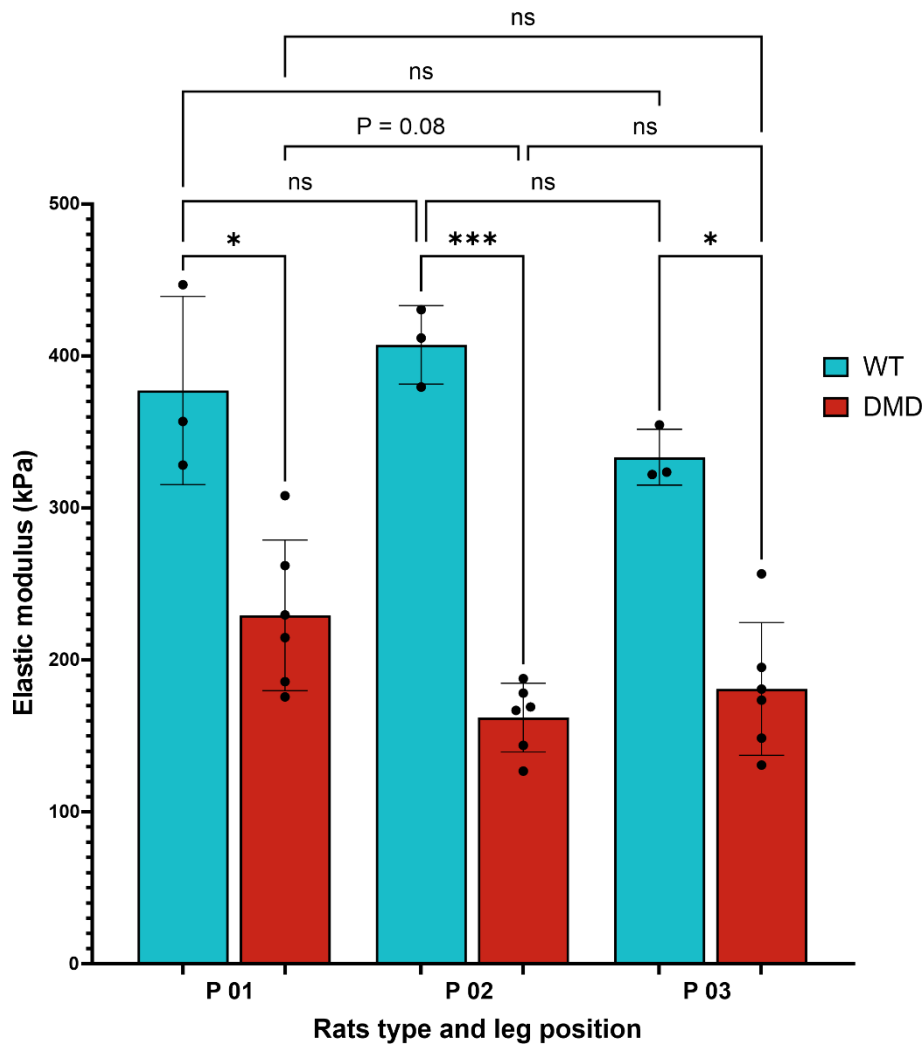


Figure 88 : Histogramme montrant les moyennes des rigidités des muscles TA dans toutes les positions par rat WT et DMD âgés de 10 mois.

Ces résultats montrent de manière significative que, à l'âge de 10 mois, correspondant à la fin de vie des rats DMD, la rigidité des muscles WT est plus élevée que celle des muscles DMD, indépendamment de la position de mesure (Figure 88). Cela met en évidence une altération de la rigidité musculaire chez les rats DMD à un stade avancé de la maladie.

## 2. Analyses biologiques et fonctionnelles :

Lors du processus de régénération musculaire, qui est particulièrement accentué dans le cas de la DMD en raison de la dégénérescence des fibres musculaires, les cellules satellites jouent un rôle clé. Elles sont activées en myoblastes, qui migrent et prolifèrent afin de fusionner et de reconstruire les fibres musculaires endommagées. Ces fonctions de migration et de prolifération

sont étroitement liées au cytosquelette des cellules, qui joue un rôle important dans leurs propriétés mécaniques.

Dans cette étude, nous avons voulu explorer ces fonctions ainsi qu'examiner l'expression des gènes et la structure des myoblastes. En comprenant les mécanismes sous-jacents à la migration, la prolifération et la structure des myoblastes, nous pouvons obtenir des informations précieuses sur les altérations spécifiques observées dans le contexte de la DMD.

Il est intéressant de noter qu'une étude complémentaire portant sur la protéine desmine au sein des fibres musculaires du muscle EDL a été lancée. La desmine est une protéine du cytosquelette impliquée dans le maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle des cellules musculaires. Son rôle est particulièrement important dans les fibres musculaires, car elle contribue à la stabilité de la structure sarcomérique, au maintien du lien entre les myofibrilles ainsi qu'à la transmission des forces contractiles.

## 2.1. Migration et prolifération des myoblastes, illustration de deux fonctions cellulaires en lien avec le cytosquelette :

Dans cette section de l'étude, plusieurs paramètres liés aux fonctions cellulaires des myoblastes ont été mesurés : le facteur de prolifération, la vitesse de migration, le temps de persistance et le coefficient de diffusion. Ces mesures ont été effectuées aux trois points temporels suivants : 1 mois (avec un effectif de  $n = 2$ , sauf pour le facteur de prolifération où nous avons seulement  $n = 1$ ), 6 mois ( $n = 4$  pour les rats WT et  $n = 3$  pour les rats DMD) et 10 mois ( $n = 2$  pour les rats WT et  $n = 1$  pour les rats DMD). Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous :

### 2.1.1. *Facteur de prolifération :*

Comme indiqué dans la section Matériel et méthodes, le facteur de prolifération est calculé à partir du rapport entre le nombre final et le nombre initial de myoblastes évalués sur un champ d'observation correspondant respectivement au dernier et premier champ d'une vidéo de 18 h.

Les résultats quantitatifs de cette expérience sont affichés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la prolifération des myoblastes WT et DMD.

Type et âges de rats (mois)	WT-1	DMD-1	WT-6	DMD-6	WT-10	DMD-10
Nombre d'images	17	16	96	97	86	40
Minimum	1.396	1.694	0.5700	0.6700	0.3600	0.5600
Maximum	2.528	3.000	3.000	2.750	1.290	1.290
Moyenne	1.948	2.280	1.464	1.412	0.7450	0.9013
Ecart-type	0.3222	0.3929	0.4636	0.3863	0.1849	0.2018
Erreur type de la moyenne	0.07815	0.09823	0.04732	0.03923	0.01994	0.03191

Sur la Figure 90, il est observé qu'il n'y a pas de différence significative dans la prolifération des myoblastes entre les rats DMD et les rats WT, et ce, à tous les âges étudiés. Cela signifie que le taux de prolifération des myoblastes, c'est-à-dire la différence entre le nombre final et le nombre initial de cellule pour un champ d'observation donné et séparé de 18 h, est similaire dans les deux groupes de rats, qu'ils soient atteints de DMD ou non. Cette observation suggère que la DMD n'a pas d'effet direct sur la capacité des myoblastes à se diviser.

D'après les résultats présentés, on peut constater une diminution de la capacité de prolifération des myoblastes au fil du temps, tant chez les rats WT que chez les rats DMD. Cette diminution est observée entre les myoblastes WT d'1 mois et ceux de 6 mois, ainsi qu'entre ceux de 6 mois et ceux de 10 mois, avec des baisses de 25% et 50% respectivement. Chez les myoblastes DMD, on observe également une diminution de la capacité de prolifération entre les groupes d'1 mois et de 6 mois, ainsi qu'entre les groupes de 6 mois et de 10 mois, avec des baisses de 38% ( $p = 0.08$ ) et 36% respectivement.

Les résultats obtenus concernant la diminution de la capacité de prolifération des myoblastes en culture au fil du temps, indépendamment de leur phénotype, peuvent en effet sembler contradictoires par rapport aux observations *in vivo* montrant une diminution de la capacité de régénération et de division des cellules satellites dans les cas de DMD. Cependant, il est important de noter que ces résultats ont été obtenus en culture *in vitro* et peuvent ne pas refléter pleinement les conditions physiologiques et l'environnement complexe dans lequel les cellules évoluent *in vivo*.

Il est tout à fait plausible que l'environnement biologique et mécanique altéré dans la DMD puisse influencer la capacité de prolifération des myoblastes *in vivo*, contrairement à ce qui est

observé dans les cultures *in vitro* où les conditions de l'environnement sont contrôlées mais simplifiées. Il serait donc nécessaire de réaliser davantage d'analyses, notamment sur des rats de 10 mois où le nombre de répliques reste encore limité, afin de mieux comprendre l'impact de l'environnement *in vivo* sur la capacité de prolifération des myoblastes dans le contexte de la DMD.

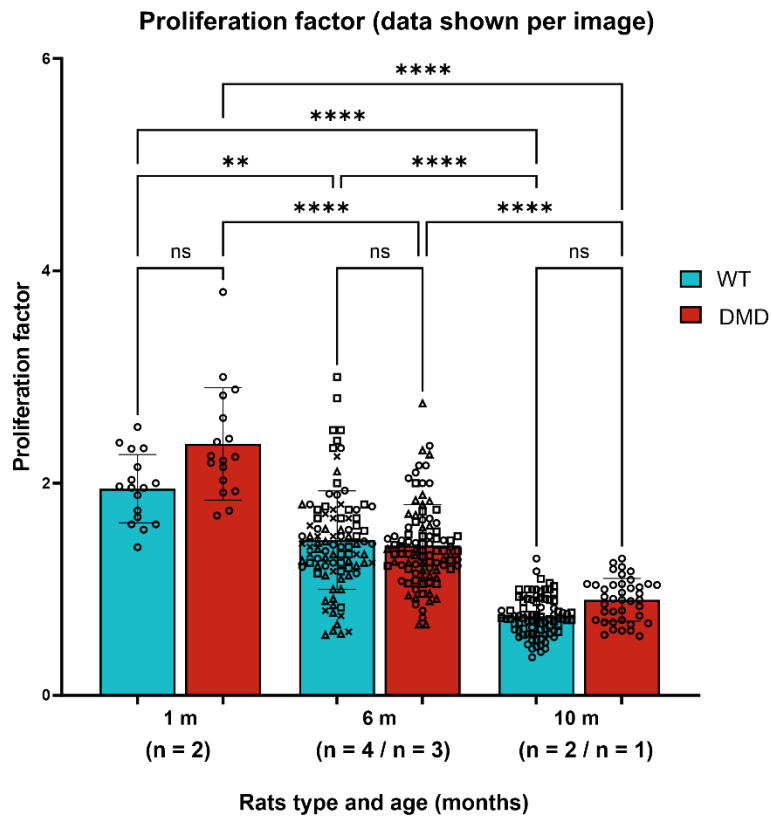


Figure 89 : Histogramme montrant les moyennes des facteurs des prolifération des myoblastes par cellule pour des rats WT et DMD suivant l'âge (mois). Sur le graphique chaque symbole représente un rat unique. Le nombre de n indique le nombre de rats évalués.

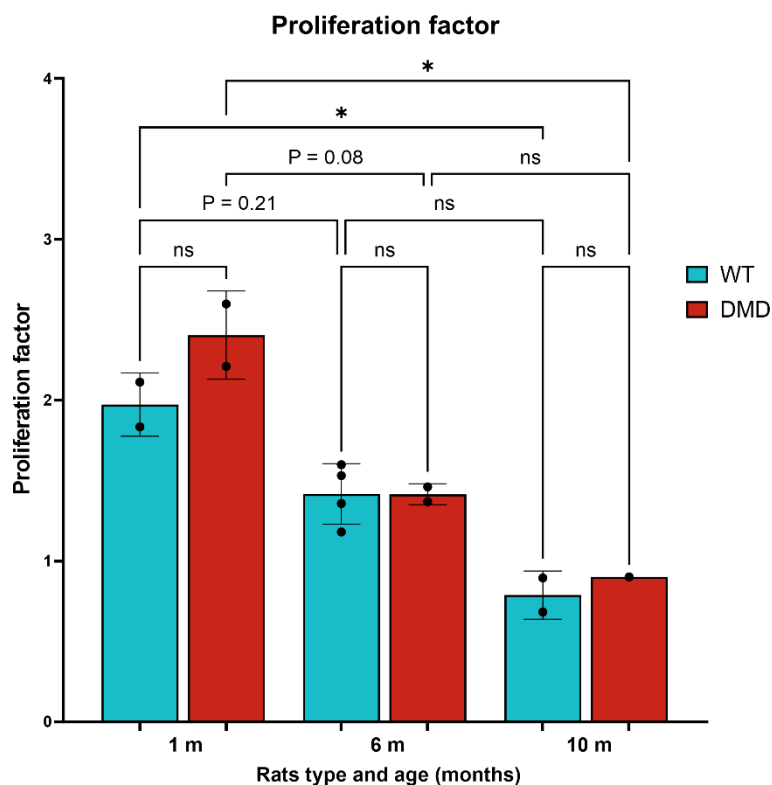


Figure 90 : Histogramme montrant les moyennes des facteurs de prolifération des myoblastes par rat WT et DMD suivant l'âge (mois).

Ce résultat corrobore une étude menée par des chercheurs de notre équipe sur le rats R-DMDdel52 qui quantifie le nombre de cellules satellites Ki67+ (marqueur de prolifération) dans le muscle TA (Taglietti et al., 2023). Dans cette étude, les cellules satellites WT et DMD présentent globalement de façon équivalente Ki67 et ceci à tous les âges (3 semaines, 6 mois et 12 mois). Cette expression diminue également avec l'âge.

### Migration

Nous avons analysé la fonction migration en étudiant trois paramètres : la vitesse de migration, le coefficient de diffusion et le temps de persistance. Pour mesurer ces paramètres, nous avons utilisé une méthode de suivi des cellules (voir Matériel et méthodes). Il convient de souligner que les résultats les plus significatifs sont ceux obtenus pour des rats d'1 mois et de 6 mois. Nous nous concentrerons principalement sur ces résultats. Ceci tient au fait que nous disposons d'un nombre limité d'échantillons pour les myoblastes WT et DMD de 10 mois, avec seulement n = 2 et n = 1 respectivement. Par conséquent, les données obtenues à partir des rats d'1 mois et de 6 mois fournissent une base plus solide pour nos analyses et nos conclusions.

#### a. Suivi des cellules (Tracking) :

La Figure 91 présente le suivi de l'ensemble des cellules pour les rats WT et DMD d'1 mois et 6 mois. De manière générale, nous remarquons que les cellules DMD, indépendamment de leur âge, occupent une surface plus étendue que les cellules WT sur une même période.



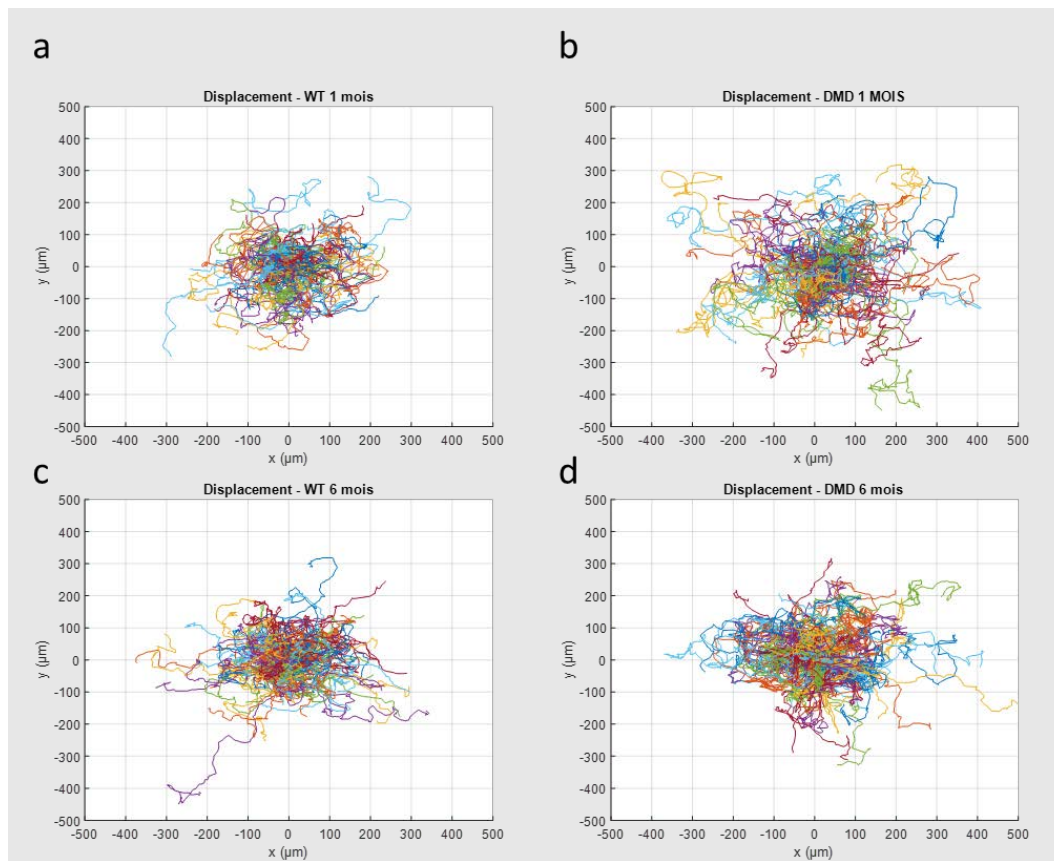


Figure 91 : Suivi cellulaire sur un plan (x,y) de l'ensemble des myoblastes de rats WT et DMD d'1 mois et de 6 mois.

b. Vitesse de migration :

À partir des données de suivi, nous avons pu relever les vitesses moyennes de migration des myoblastes des rats WT et DMD à différents âges.

Les résultats quantitatifs sont représentés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la vitesse de migration des myoblastes WT et DMD.

Type et âges de rats (mois)	WT-1	DMD-1	WT-6	DMD-6	WT-10	DMD-10
Nombre de cellules	62	68	116	94	84	37
Minimum ( $\mu\text{m}/\text{min}$ )	0.3994	0.5163	0.2343	0.2272	0.1322	0.4162
Maximum ( $\mu\text{m}/\text{min}$ )	1.558	1.975	1.314	2.145	0.7021	2.104
Moyenne ( $\mu\text{m}/\text{min}$ )	0.9313	1.193	0.6367	1.095	0.3792	1.051
Ecart-type ( $\mu\text{m}/\text{min}$ )	0.2302	0.3353	0.2371	0.4387	0.1226	0.3785
Erreur type de la moyenne ( $\mu\text{m}/\text{min}$ )	0.02923	0.04066	0.02201	0.04525	0.01338	0.06223

Sur la Figure 92 et la Figure 93, nous constatons que, indépendamment de l'âge des rats à partir desquels les myoblastes sont issus, la vitesse de migration des myoblastes DMD est supérieure à celle des myoblastes WT, et cette différence augmente avec l'âge et la progression de la maladie.

En effet, nous observons une différence de 28% à 1 mois, de 72% (\*) à 6 mois, ce qui représente plus du double, et de 177% ( $p = 0.09$ ) à 10 mois, à nouveau plus du double.

Nous constatons également un effet de l'âge sur la vitesse de migration, qui est plus prononcé chez les rats WT que chez les rats DMD. La vitesse de migration diminue de 60% ( $p = 0.09$ ) chez les rats WT et seulement de 12% chez les rats DMD entre 1 mois et 10 mois.

Ainsi, les myoblastes maintiennent des vitesses de migration élevées qui ne diminuent pas malgré la progression de la maladie. Cette observation peut être attribuée à l'environnement d'où proviennent ces cellules qui est caractérisé par une désorganisation des fibres musculaires à mesure que la maladie progresse. Il se pourrait que dans un environnement endommagé, les myoblastes DMD aient besoin d'être plus actifs. Des études supplémentaires dans ce sens pourraient fournir davantage d'informations et de réponses.

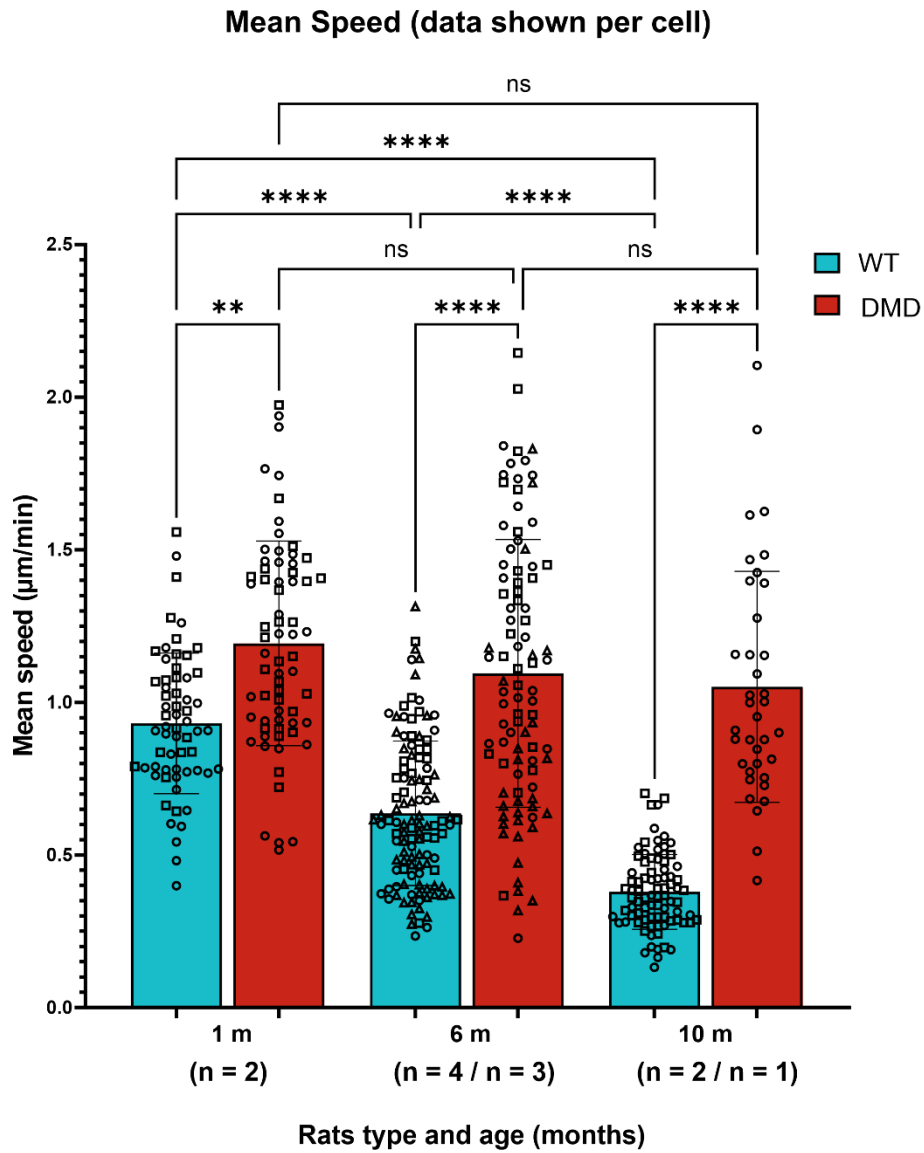


Figure 92 : Histogramme montrant les moyennes des vitesses de migration des myoblastes par cellule pour des rats WT et DMD suivant l'âge (mois). Sur le graphique chaque symbole représente un rat unique. Le nombre de n indique le nombre de rats évalués.

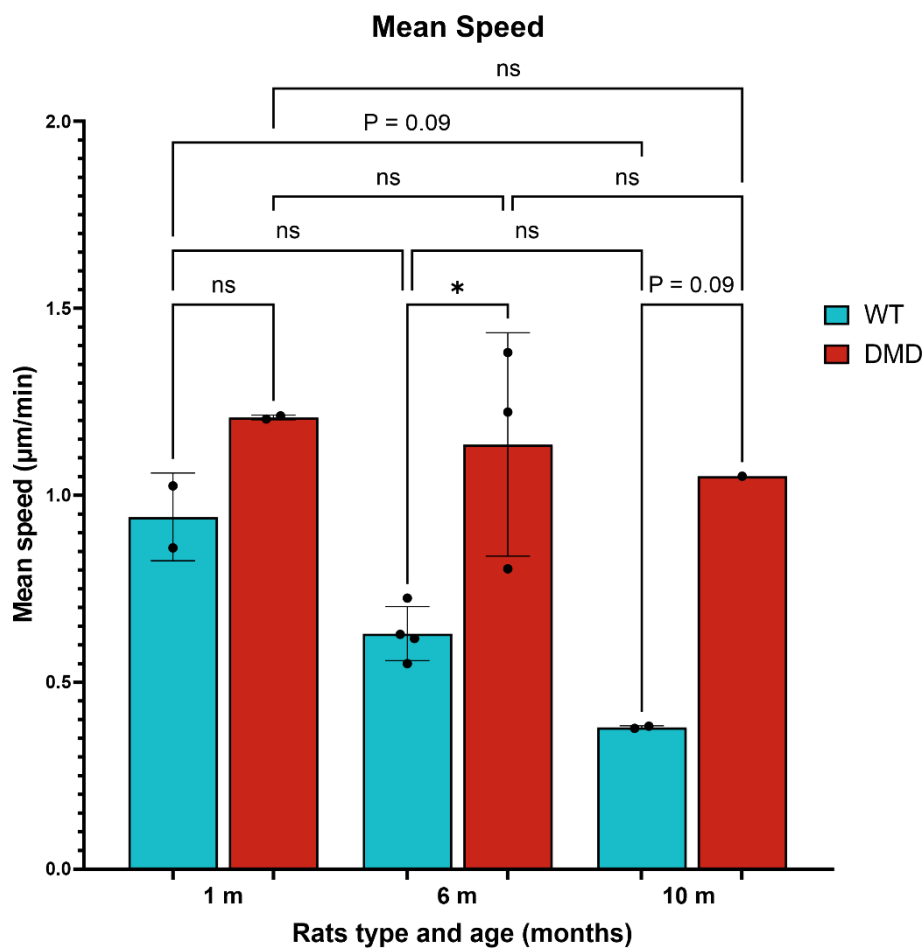


Figure 93 : Histogramme montrant les moyennes des vitesses de migration des myoblastes par rat WT et DMD suivant l'âge (mois).

c. Coefficient de diffusion :

Le deuxième critère de migration étudié est le coefficient de diffusion. Celui-ci permet de quantifier la capacité de diffusion des cellules dans leur environnement (voir section Matériel et méthodes). Les résultats quantitatifs de ces mesures sont affichés dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant le coefficient de diffusion des myoblastes WT et DMD.

Type et âges de rats (mois)	WT-1	DMD-1	WT-6	DMD-6	WT-10	DMD-10
Nombre de cellules	61	69	116	92	80	36
Minimum ( $\mu\text{m}^2/\text{min}$ )	1.551	3.225	0.2801	0.6871	0.4186	2.431
Maximum ( $\mu\text{m}^2/\text{min}$ )	17.98	31.12	17.53	24.91	8.289	21.10
Moyenne ( $\mu\text{m}^2/\text{min}$ )	9.091	14.06	5.617	9.159	3.051	9.351
Ecart-type ( $\mu\text{m}^2/\text{min}$ )	4.238	7.033	3.589	5.030	1.920	4.459
Erreur type de la moyenne ( $\mu\text{m}^2/\text{min}$ )	0.5426	0.8467	0.3332	0.5244	0.2147	0.7432

La Figure 95 présente un histogramme comparatif des valeurs de diffusion pour chaque modèle. Les myoblastes DMD présentent une diffusion plus élevée que les myoblastes WT à tous les points temporels. Cette différence de diffusion est de 54.5% ( $p = 0.33$ ), 63% ( $p = 0.13$ ) et 206% ( $p = 0.09$ ) respectivement à 1 mois, 6 mois et 10 mois. De plus, une diminution de la diffusion est observée avec l'âge chez les WT et les DMD, mais cette diminution est plus prononcée chez les WT (66%,  $p = 0.055$ ) que chez les DMD (34%,  $p = 0.49$ ) entre 1 mois et 10 mois. Ces résultats suggèrent que les myoblastes DMD non seulement migrent plus rapidement, mais aussi qu'ils ont une exploration plus étendue de leur environnement à mesure que la maladie progresse. Ces observations soutiennent l'idée que les myoblastes DMD sont plus actifs du point de vue de la vitesse de migration et de la surface d'exploration.

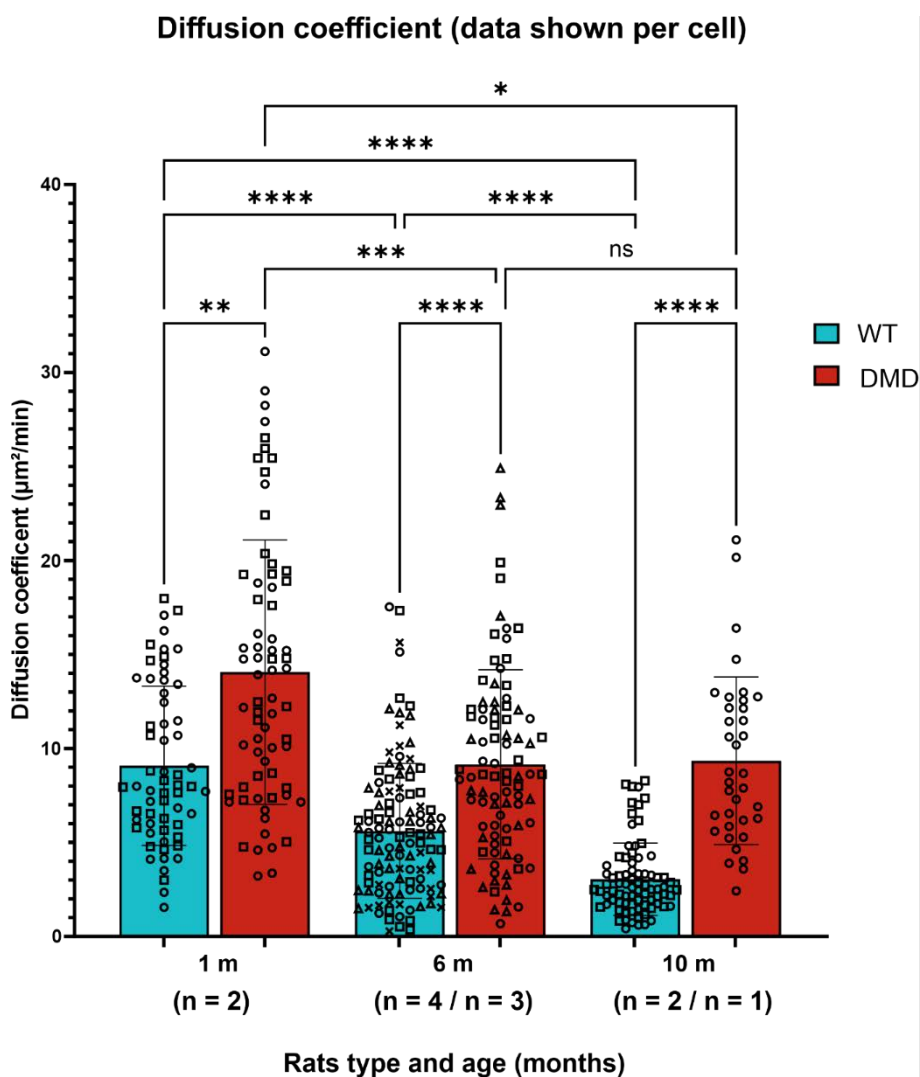


Figure 94 : Histogramme montrant les moyennes des coefficients de diffusion des myoblastes par cellule pour des rats WT et DMD suivant l'âge (mois). Sur le graphique chaque symbole représente un rat unique. Le nombre de n indique le nombre de rats évalués.

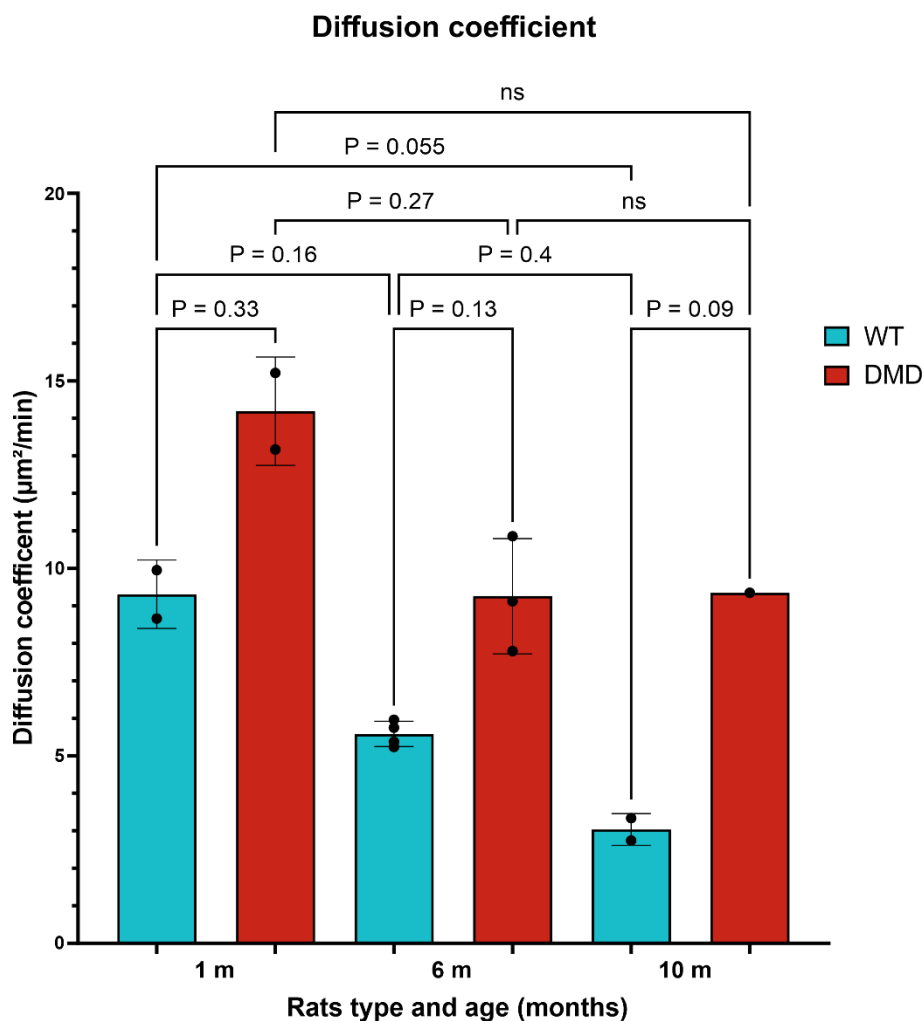


Figure 95 : Histogramme montrant les moyennes des coefficients de diffusion des myoblastes par rat WT et DMD suivant l'âge (mois).

d. Persistance :

Le troisième critère étudié est le temps de persistance. Celui-ci indique la capacité d'une cellule à maintenir une trajectoire pendant la migration. Les résultats obtenus sont affichés dans le Tableau 14, la Figure 96 et la Figure 97.

Tableau 14 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant le temps de persistance des myoblastes WT et DMD.

Type et âges de rats (mois)	WT-1	DMD-1	WT-6	DMD-6	WT-10	DMD-10
Nombre de cellules	62	69	112	84	84	36
Minimum (min)	2.222e-014	2.246e-014	2.220e-014	2.220e-014	5.566	2.222e-014
Maximum (min)	44.75	57.37	68.23	31.57	80.42	33.88
Moyenne (min)	17.69	16.50	21.39	9.481	30.62	9.927
Ecart-type (min)	11.42	12.18	15.06	8.614	17.05	9.242
Erreur type de la moyenne (min)	1.450	1.466	1.423	0.9398	1.860	1.540

Dans la Figure 97, les résultats indiquent qu'il n'y a pas de différence significative au sujet de la persistance entre les myoblastes WT et les myoblastes DMD à 1 mois. Cependant, cette situation change à 6 mois et à 10 mois, où les myoblastes WT présentent un plus grand temps de persistance et un meilleur maintien de la trajectoire que les myoblastes DMD. À 6 mois, la différence de temps de persistance est de 56% (\*) et à 10 mois, elle atteint 68% (\*).

De plus, une augmentation du temps de persistance est observée chez les myoblastes WT avec l'âge (73%,  $p = 0.15$  entre 1 mois et 10 mois), alors qu'une diminution du temps de persistance est constatée chez les myoblastes DMD (40%,  $p = 0.3$  entre 1 mois et 10 mois).

Les résultats obtenus démontrent que les myoblastes DMD présentent un motif de mouvement plus désordonné que les myoblastes WT, et cette caractéristique est observable à tous les âges. Par ailleurs, cette tendance de mouvement désordonné et de vitesse de migration élevée s'intensifie avec l'âge, démontrant ainsi une corrélation possible avec la progression de la maladie.

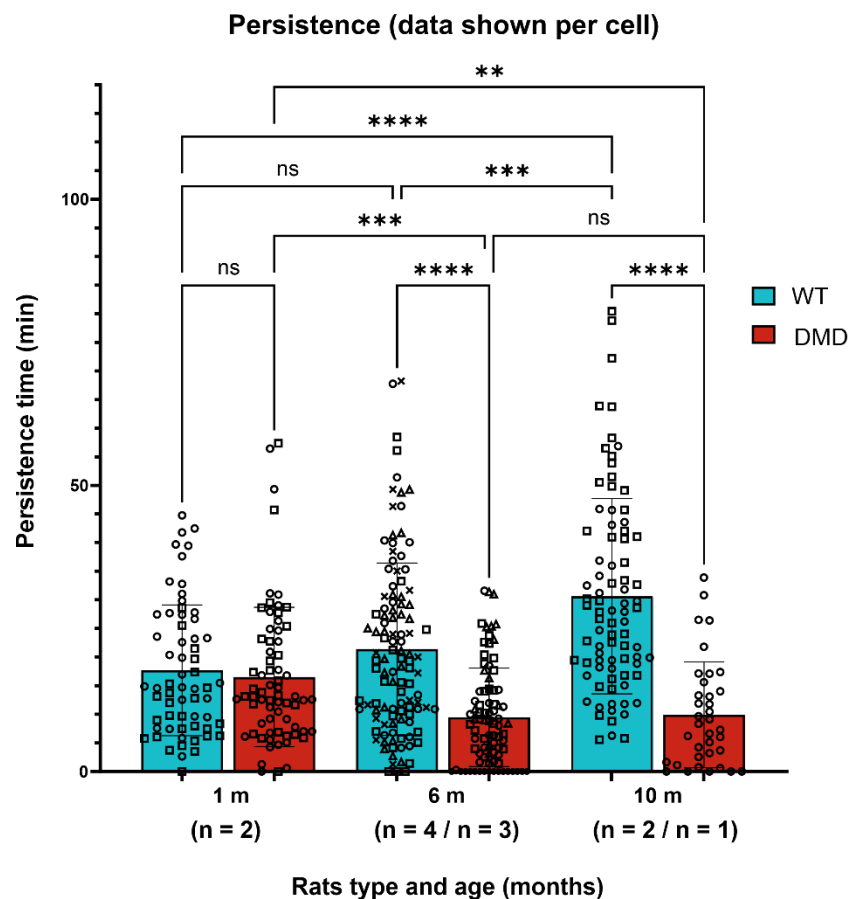


Figure 96 : Histogramme montrant les moyennes des temps de persistance des myoblastes par cellule pour des rats WT et DMD suivant l'âge (mois). Sur le graphique chaque symbole représente un rat unique. Le nombre de n indique le nombre de rats évalués.

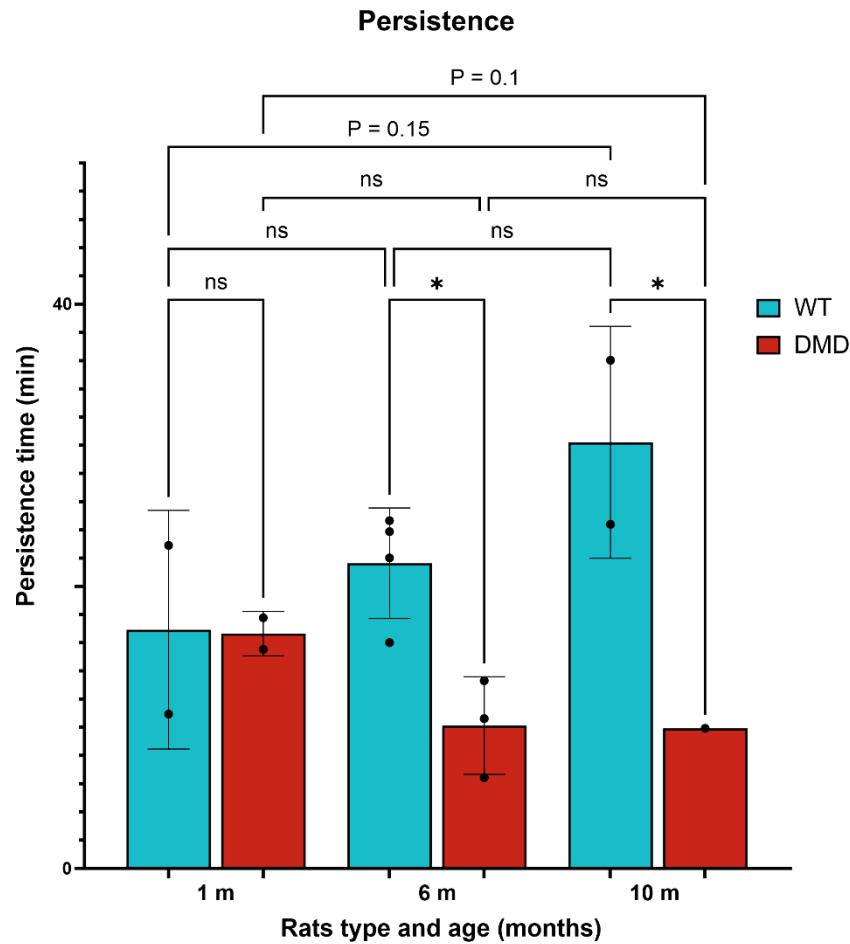


Figure 97 : Histogramme montrant les moyennes des temps de persistance des myoblastes par rat WT et DMD suivant l'âge (mois).

## 2.2. Structure des myoblastes :

Afin d'apporter des éléments de réflexion à propos de certains de nos résultats mécaniques et fonctionnels, en particulier ceux liés aux myoblastes WT et DMD, nous avons réalisé des mesures de hauteurs, de surfaces ainsi que des immunomarquages de la structure des myoblastes WT et DMD à des âges spécifiques (1 mois, 6 mois et 10 mois). Dans cette analyse, nous accorderons une attention particulière aux données obtenues à 1 mois et 6 mois, étant donné que le nombre de rats disponibles était limité ( $n = 2$  pour les myoblastes WT et  $n = 1$  pour les myoblastes DMD) à l'âge de 10 mois.

### 2.2.1. *Hauteur des myoblastes :*

Les mesures de hauteur des cellules ont été examinées en premier lieu. Les résultats quantitatifs des hauteurs obtenues sont présentés dans le Tableau 15. La hauteur de chaque cellule est représentée par un symbole dans l'histogramme de la Figure 98, tandis que la moyenne des hauteurs de cellules par rat est représentée par un point dans l'histogramme de la Figure 99.



Selon ces figures, aucune différence de hauteur n'est observée entre les myoblastes WT et DMD à tous les âges des rats. De plus, la hauteur des cellules reste constante avec l'âge.

Tableau 15 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la hauteur des myoblastes WT et DMD.

Type et âges de rats (mois)	WT-1	DMD-1	WT-6	DMD-6	WT-10	DMD-10
Nombre de cellules	64	54	29	51	27	32
Minimum (µm)	1.894	1.855	1.658	1.708	2.259	1.701
Maximum (µm)	5.660	5.070	5.042	6.853	4.708	6.529
Moyenne (µm)	3.454	3.425	3.615	3.807	3.566	3.488
Ecart-type (µm)	0.8397	0.6460	0.8951	1.096	0.6635	0.9108
Erreur type de la moyenne (µm)	0.1050	0.08791	0.1662	0.1535	0.1277	0.1610

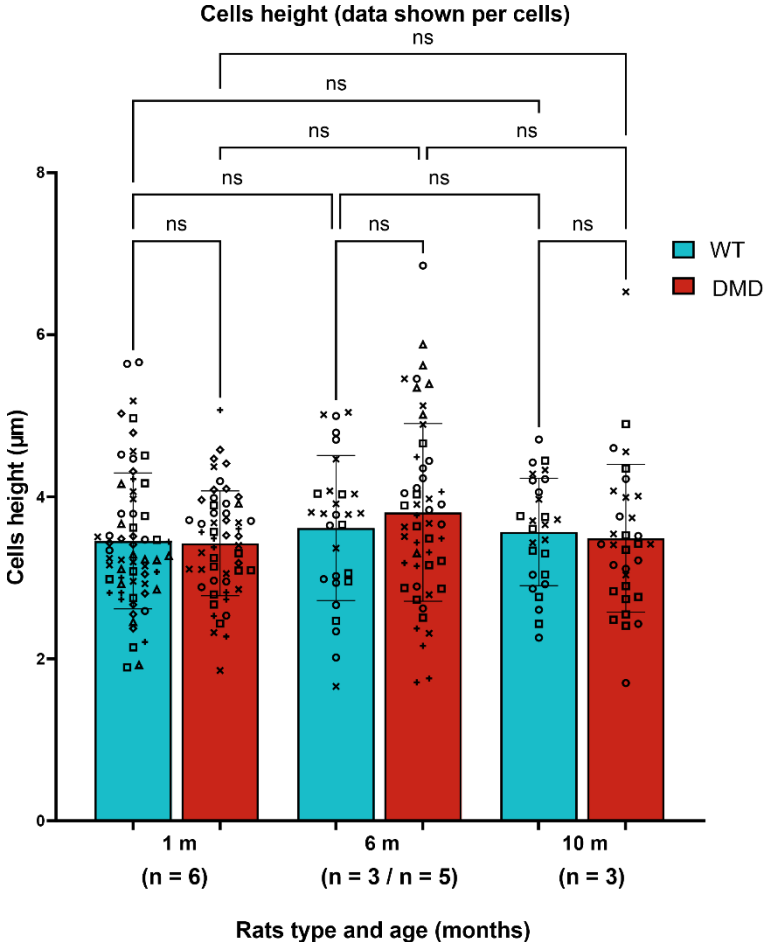


Figure 98 : Histogramme montrant les moyennes des hauteurs des myoblastes par cellule pour des rats WT et DMD suivant l'âge (mois). Sur le graphique chaque symbole représente un rat unique. Le nombre de n indique le nombre de rats évalués.

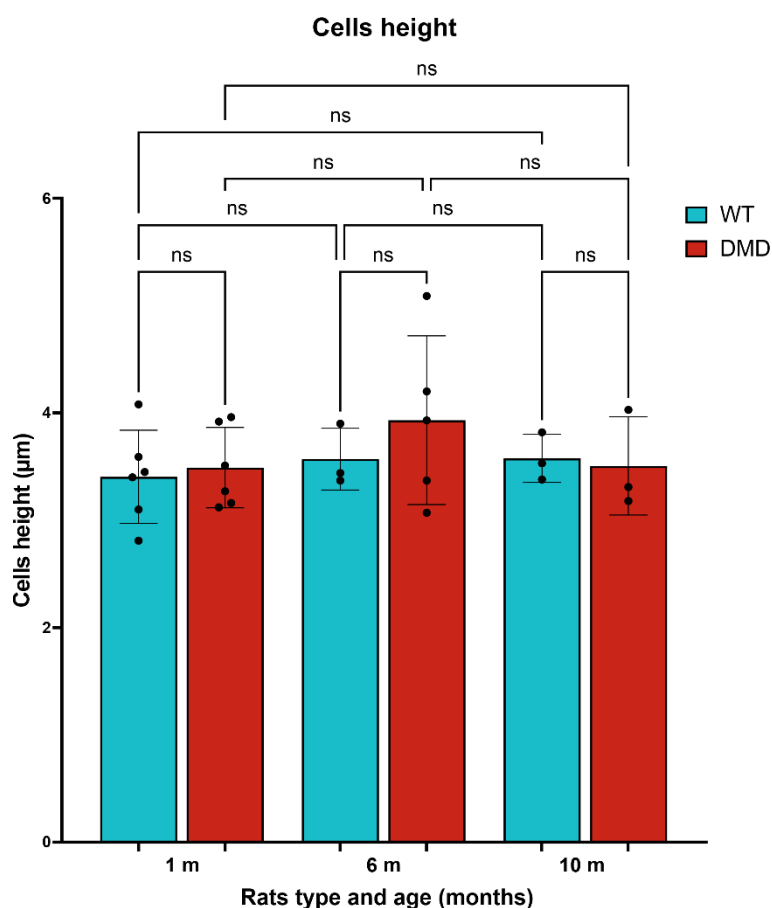


Figure 99 : Histogramme montrant les moyennes des hauteurs des myoblastes par rat WT et DMD suivant l'âge (mois).

### 2.2.2. Surface des cellules :

Le deuxième critère que nous avons choisi d'étudier est la surface de nos myoblastes. Cela a été réalisé en se basant sur une analyse d'images d'immunomarquage, conformément aux méthodes décrites dans la partie Matériels et méthodes. Le deuxième critère que nous avons choisi d'étudier est la surface des myoblastes, qui a été évaluée en analysant les images d'immunomarquage suivant les méthodes décrites dans la section Matériel et méthodes. Les résultats sont présentés le Tableau 16 ainsi que sur les Figure 100 et Figure 101.

Tableau 16 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la surface des myoblastes WT et DMD.

Type et âges de rats (mois)	WT-1	DMD-1	WT-6	DMD-6	WT-10	DMD-10
Nombre de cellules	33	43	32	31	12	21
Minimum (µm <sup>2</sup> )	199.2	307.7	287.6	495.1	306.9	218.9
Maximum (µm <sup>2</sup> )	707.4	1391	856.2	1188	476.9	845.6
Moyenne (µm <sup>2</sup> )	473.9	829.4	529.8	841.2	407.5	459.6
Ecart-type (µm <sup>2</sup> )	109.4	227.3	175.3	189.0	58.39	160.0

Erreur type de la moyenne ( $\mu\text{m}^2$ )	19.04	34.66	30.99	33.94	16.85	34.91
---	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Les résultats sont affichés dans le Tableau 16 ainsi que sur les Figure 100 et Figure 101.

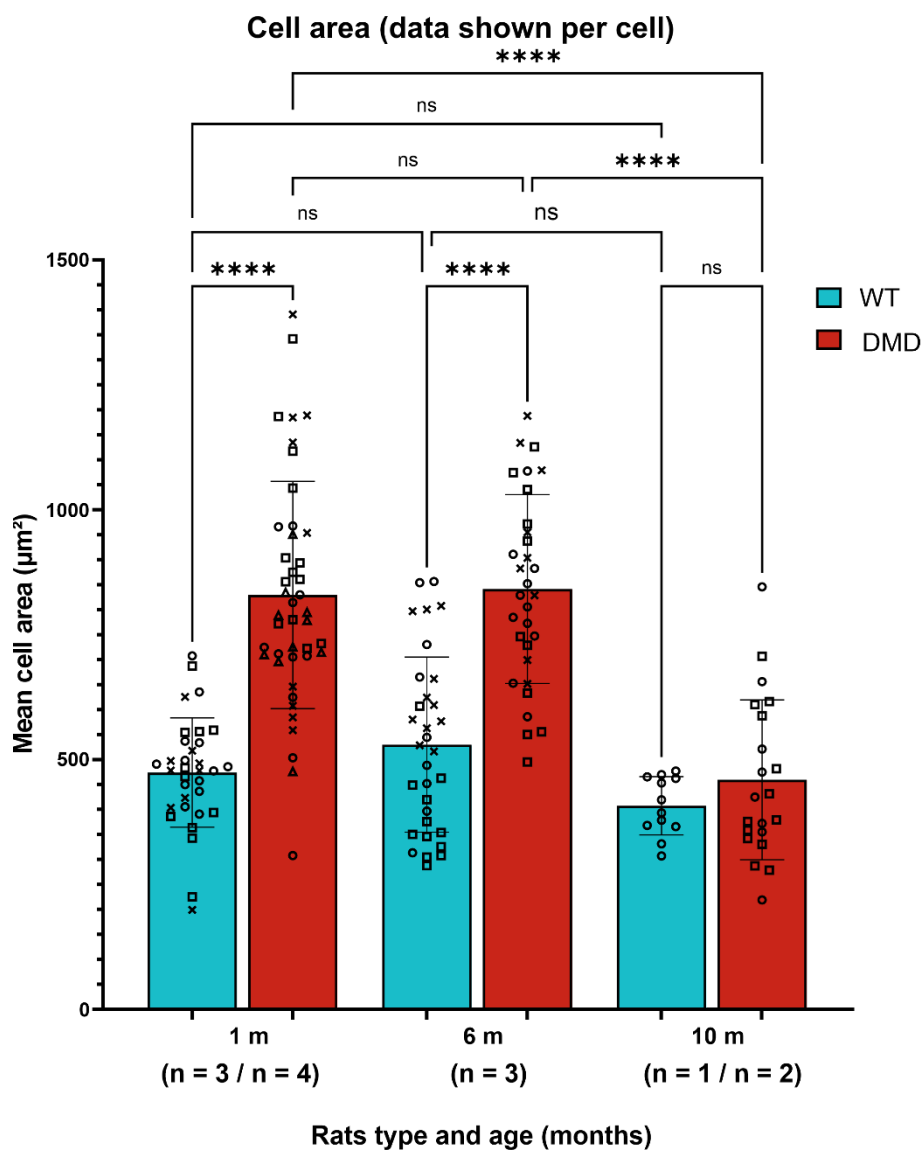


Figure 100 : Histogramme montrant les moyennes des surfaces des myoblastes par cellule pour des rats WT et DMD suivant l'âge (mois). Sur le graphique chaque symbole représente un rat unique. Le nombre de n indique le nombre de rats évalués.

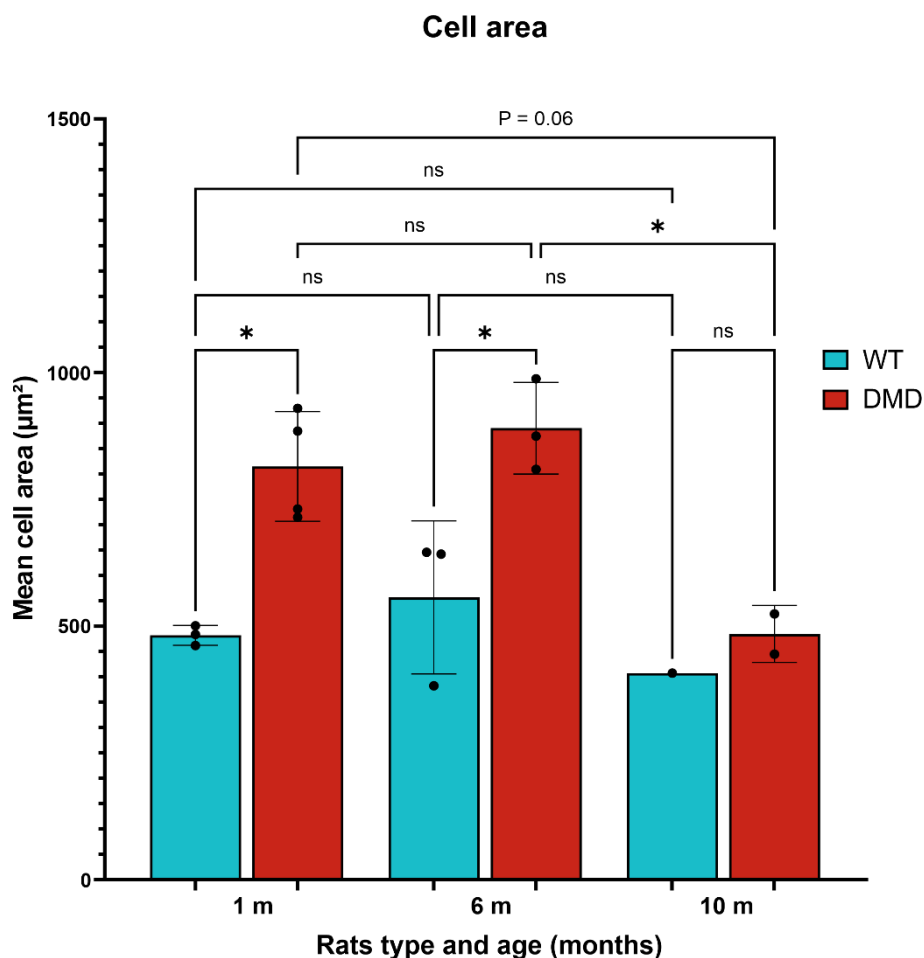


Figure 101 : Histogramme montrant les moyennes des surfaces des myoblastes par rat WT et DMD suivant l'âge (mois).

Les résultats obtenus révèlent que les myoblastes DMD occupent une surface plus étendue que les myoblastes WT à 1 mois et 6 mois. Cette différence représente 75% (\*) à 1 mois et 59% (\*) à 6 mois.

Par ailleurs, nous constatons que les myoblastes WT maintiennent une surface constante, indépendamment de l'âge du rat. En revanche, nos données montrent qu'à 10 mois, les myoblastes WT et DMD occupent la même surface. La Figure 102 illustre un exemple de ces résultats.

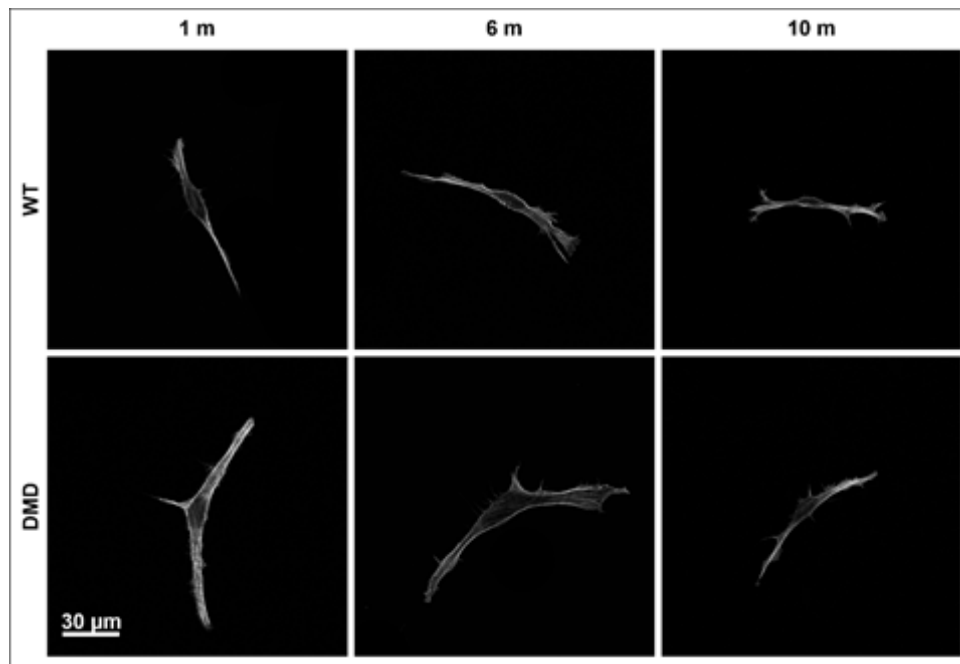


Figure 102 : Marquage des filaments d'actine des myoblastes par la rhodamine phalloïdine. Le marquage a permis notamment de calculer les surfaces des myoblastes WT et DMD à différents âges (1 mois, 6 mois et 10 mois).

Étant donné que les myoblastes WT et DMD présentent la même hauteur (Figure 99), cela laisse supposer que les myoblastes DMD d'1 mois et 6 mois ont un volume plus important que les myoblastes WT.

### 2.2.3. Taux d'actine :

L'actine est une protéine essentielle du cytosquelette cellulaire, qui joue un rôle crucial dans différentes fonctions et propriétés mécaniques cellulaires, telles que la migration, l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire, la morphogenèse, la mécanotransduction, la forme cellulaire et la rigidité. Pour évaluer la présence de l'actine dans nos échantillons cellulaires, nous avons déterminé un taux d'actine défini comme la surface d'actine dense divisée par la surface totale de la cellule, tel que décrit dans la section Matériels et méthodes. Les résultats de cette quantification sont représentés dans le Tableau 17 les Figure 103 et Figure 104.

Tableau 17 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant le taux d'actine des myoblastes WT et DMD.

Type et âges de rats (mois)	WT-1	DMD-1	WT-6	DMD-6	WT-10	DMD-10
Nombre de cellules	33	43	33	32	12	21
Minimum	8.900	23.42	8.820	11.27	13.98	8.160
Maximum	49.68	56.70	43.81	53.65	45.17	51.06
Moyenne	23.34	37.29	29.49	30.92	32.67	28.31
Ecart-type	10.07	6.862	9.703	9.068	8.828	9.010

Erreur type de la moyenne	1.752	1.046	1.689	1.603	2.548	1.966
---------------------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

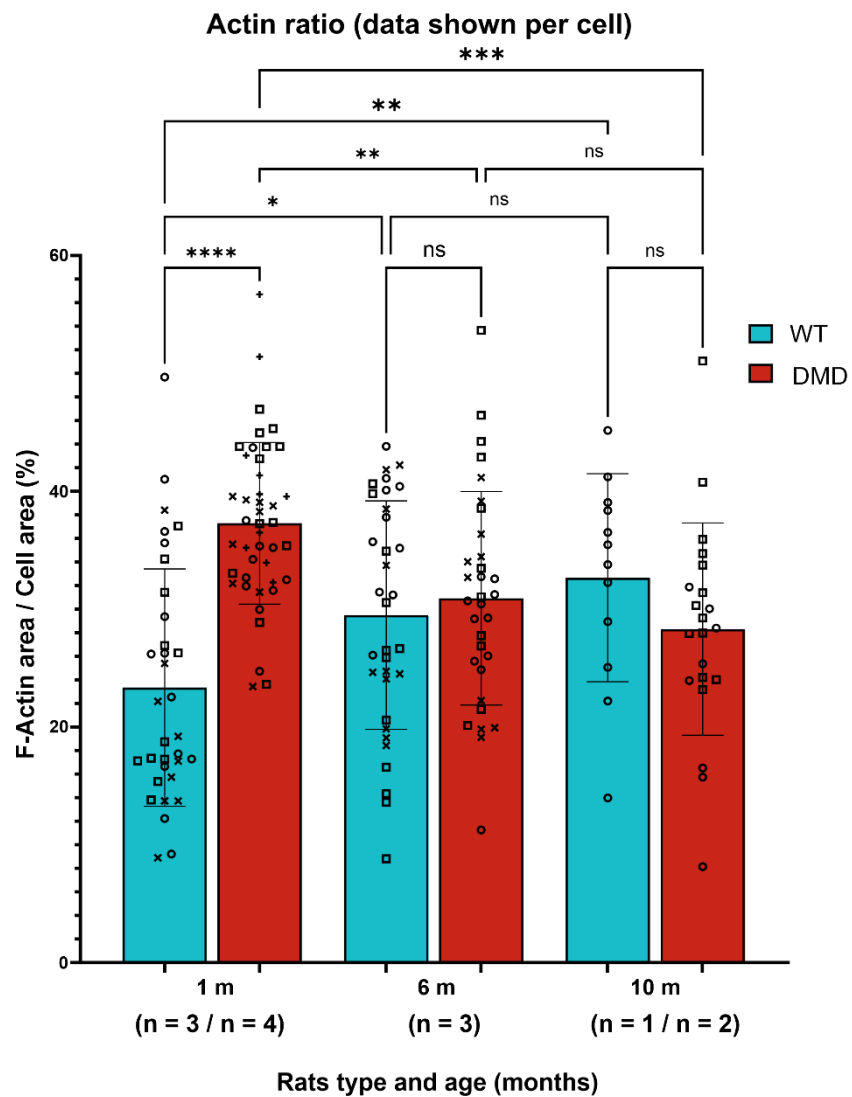


Figure 103 : Histogramme montrant les moyennes des taux d'actine des myoblastes par cellule pour des rats WT et DMD suivant l'âge (mois). Sur le graphique chaque symbole représente un rat unique. Le nombre de n indique le nombre de rats évalués.

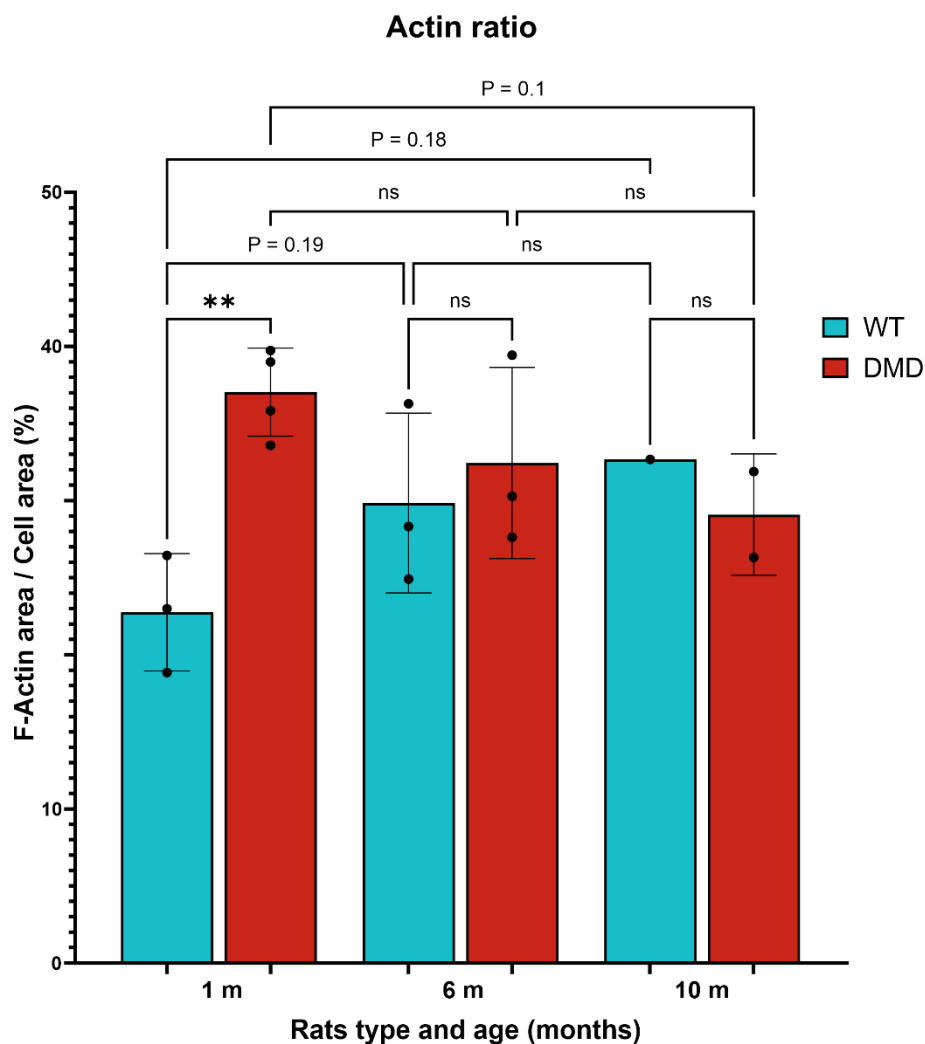


Figure 104 : Histogramme montrant les moyennes des taux d'actine des myoblastes par rat WT et DMD suivant l'âge (mois).

Nous constatons qu'à l'âge d'1 mois, les myoblastes DMD présentent un taux d'actine plus élevé que les myoblastes WT (60%, \*). Cependant, cette différence s'atténue aux stades ultérieurs, c'est-à-dire à 6 mois et 10 mois.

La différence significative observée avec des taux d'actine plus élevés chez les myoblastes DMD à 1 mois suggère une plus grande quantité de fibres de stress dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Bien que les raisons de cette observation ne soient pas claires pour le moment, ces résultats mis en corrélation avec les vitesses de migration plus élevées observées chez les myoblastes DMD par rapport aux myoblastes WT à 1 mois, suggèrent une possible relation entre la quantité d'actine, la migration cellulaire accrue et les caractéristiques pathologiques associées à la DMD.

#### 2.2.4. *Nombre de spots de paxilline :*

Nous nous sommes également intéressés à la protéine paxilline, qui joue un rôle clé dans l'adhérence cellulaire et, par conséquent, dans la migration cellulaire. Pour cela, nous avons évalué le nombre de spots de paxilline dans les myoblastes.

Les résultats de cette étude sont présentés dans le Tableau 18 et les Figure 105 et Figure 106.

*Tableau 18 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant le nombre de spots de paxilline des myoblastes WT et DMD.*

Type et âges de rats (mois)	WT-1	DMD-1	WT-6	DMD-6	WT-10	DMD-10
Nombre de cellules	33	43	33	32	12	21
Minimum	7.000	18.00	6.000	16.00	5.000	5.000
Maximum	127.0	278.0	108.0	231.0	50.00	67.00
Moyenne	53.55	108.0	40.67	89.94	18.25	27.48
Ecart-type	34.72	66.18	29.63	51.01	13.92	15.19
Erreur type de la moyenne	6.044	10.09	5.158	9.017	4.017	3.315



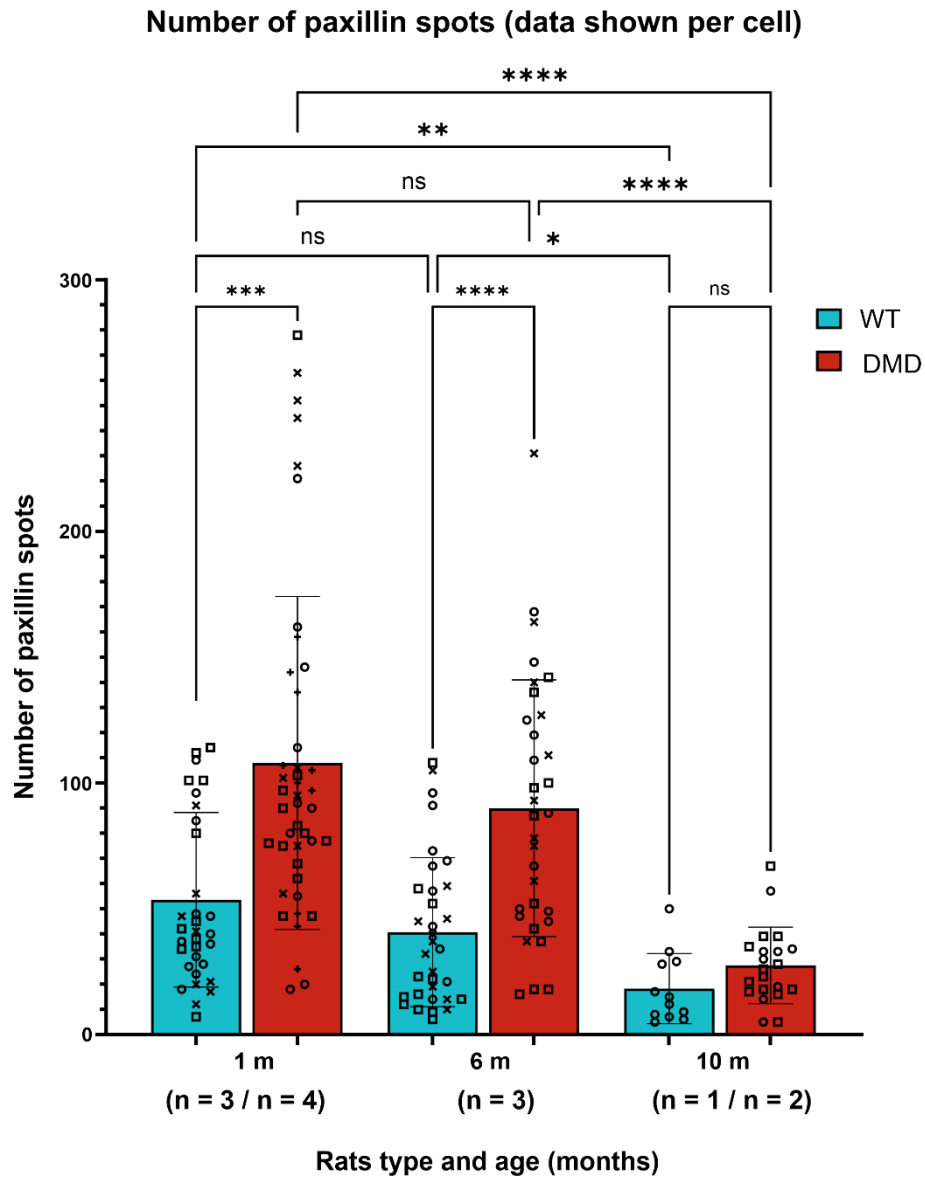


Figure 105 : Histogramme montrant les moyennes des nombres de spots de la paxilline des myoblastes par cellule pour des rats WT et DMD suivant l'âge (mois). Sur le graphique chaque symbole représente un rat unique. Le nombre de n indique le nombre de rats évalués.

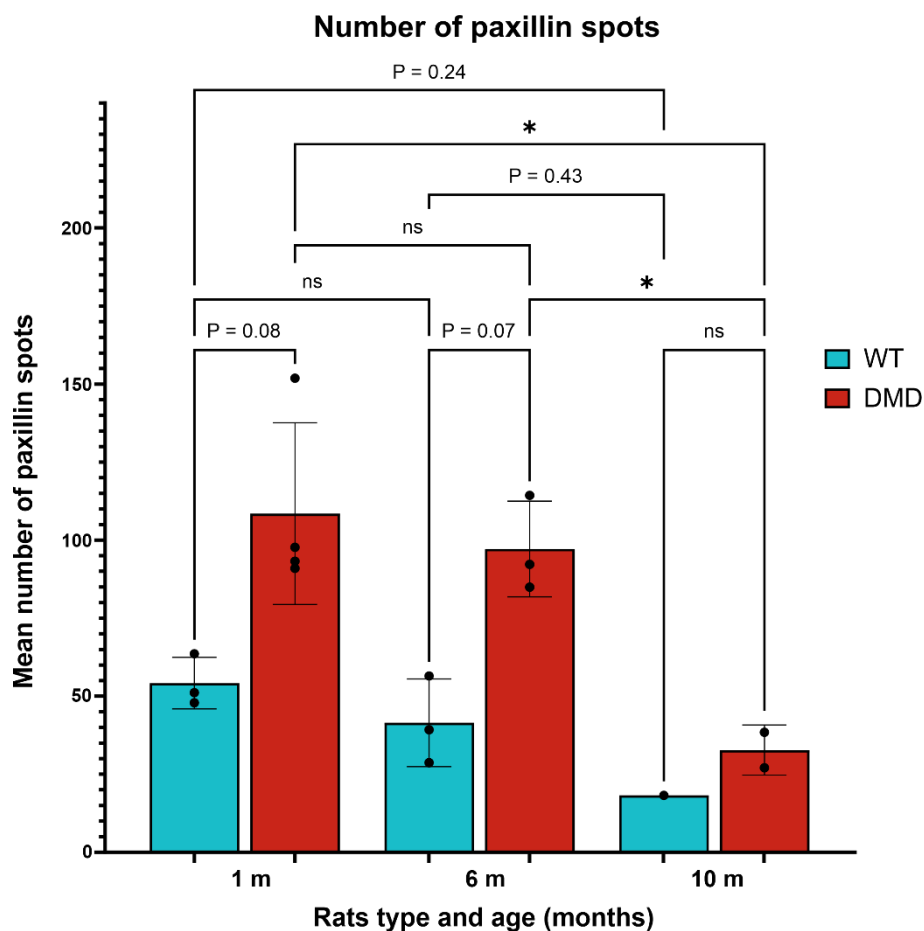


Figure 106 : Histogramme montrant les moyennes des nombres de spots de paxilline des myoblastes par rat WT et DMD suivant l'âge (mois).

Nous avons observé que le nombre de spots de paxilline est plus élevé chez les myoblastes DMD que chez les myoblastes WT, avec une différence plus prononcée à 1 mois et 6 mois. En effet, les myoblastes DMD présentent une augmentation de 102% ( $p = 0.08$ ) et 121% ( $p = 0.07$ ) respectivement par rapport aux WT. Cependant, il est important de noter que le nombre de spots de paxilline chez les myoblastes DMD diminue considérablement entre 6 mois et 10 mois, avec une baisse de 75% (\*). Malgré cette diminution, le nombre de spots de paxilline chez les myoblastes DMD reste nettement supérieur à celui des myoblastes WT.

Nous remarquons à partir de ces résultats que le nombre de spots de paxilline est plus grand chez les myoblastes DMD que chez les WT. Cette différence est plus prononcée à 1 mois et 6 mois avec une différence de 102% ( $p = 0.08$ ) et 121% ( $p = 0.07$ ) respectivement.

Ce nombre de spots de paxilline baisse considérablement chez les DMD entre 6 mois et 10 mois (75% et \*).

La paxilline est l'une des principales protéines impliquées dans les sites d'adhérences médiés par l'intégrine. Les différents domaines de la paxilline ont des fonctions distinctes dans

l'ensemble du processus de mouvement cellulaire, et ils sont essentiels dans l'adhérence cellulaire, la migration, la transmission du signal et les interactions protéine-protéine. Des études récentes ont rapporté que des déficits en dystrophine (chez la souris mdx) ou en  $\gamma$ -sarcoglycane (chez la souris  $\gamma$ SG<sup>-/-</sup>), qui sont des composants du complexe dystroglycane, entraînent une régulation positive de nombreuses protéines d'adhérence focale dont la paxilline phosphorylée s'avère être l'une des plus importantes. Par conséquent, il a été suggéré que dans cette situation, la régulation positive de la paxilline pourrait jouer un rôle dans la stabilisation des protéines structurales telles que la tubuline, contribuant ainsi à la stabilité des myofibrilles. De plus, il est possible que le renouvellement rapide de la paxilline, au niveau des adhérences focales, fournisse une stabilité d'adhérence sans entraîner une augmentation de la force d'adhérence (Sen et al., 2009).

### 2.2.5. Nombre de spots de paxilline par unité de surface :

Afin d'étudier plus en détail cette protéine, nous avons rapporté le nombre de spots de paxilline à la surface de chaque cellule. Nous obtenons donc un nombre de spots de paxilline par unité de surface ( $\mu\text{m}$ ).

Les résultats de cette étude sont montrés dans le Tableau 19 et les Figure 107 et Figure 108 ci-dessous.

Tableau 19 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant le nombre de spots de paxilline par unité de surface des myoblastes WT et DMD.

Type et âges de rats (mois)	WT-1	DMD-1	WT-6	DMD-6	WT-10	DMD-10
Nombre de cellules	36	33	34	35	12	22
Minimum ( $1/\mu\text{m}^2$ )	0.03107	0.03639	0.01777	0.02844	0.01585	0.01797
Maximum ( $1/\mu\text{m}^2$ )	0.2040	0.2285	0.1780	0.1981	0.1193	0.1424
Moyenne ( $1/\mu\text{m}^2$ )	0.1029	0.1373	0.06994	0.1026	0.04316	0.06117
Ecart-type ( $1/\mu\text{m}^2$ )	0.04775	0.05303	0.03808	0.04260	0.03081	0.02675
Erreur type de la moyenne ( $1/\mu\text{m}^2$ )	0.007958	0.009232	0.006530	0.007200	0.008893	0.005704

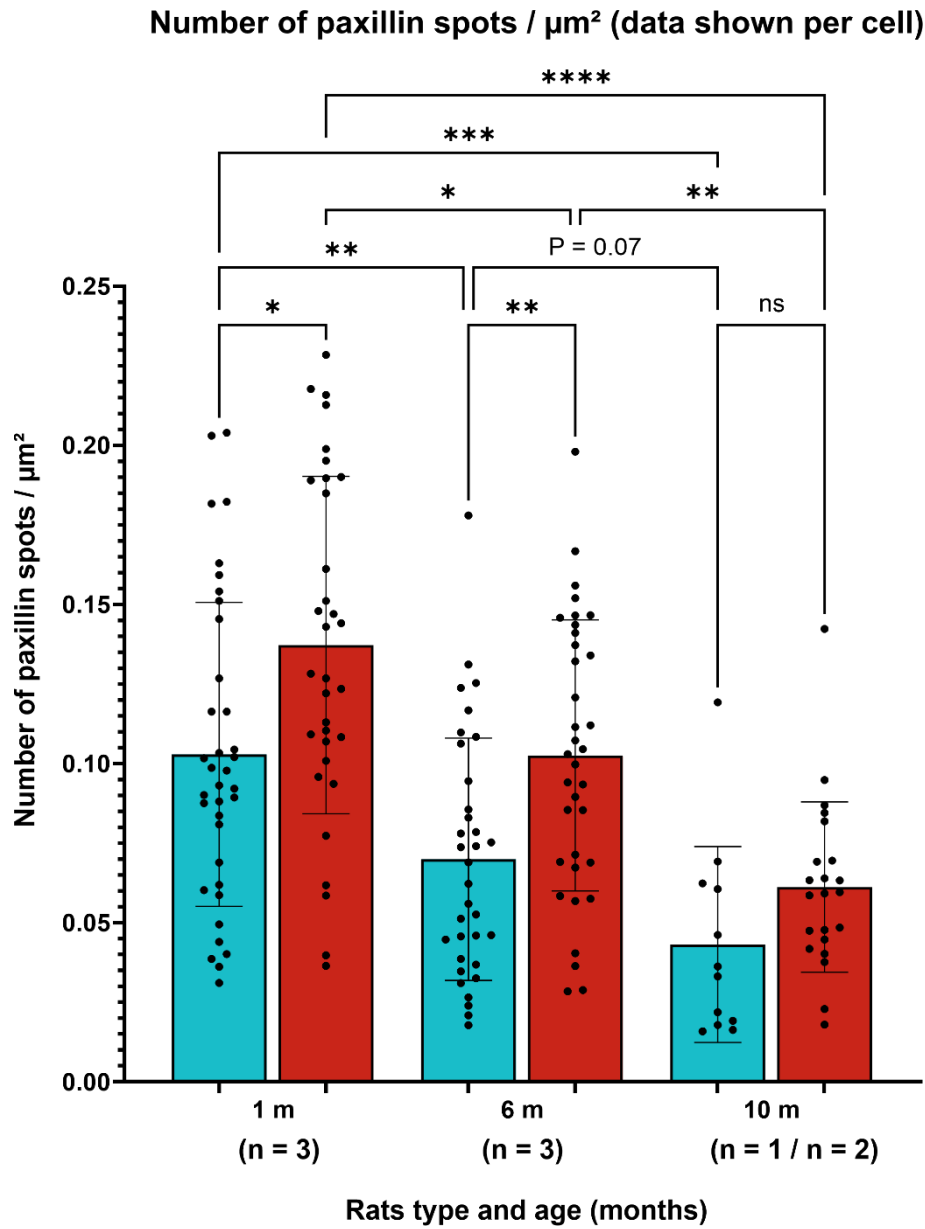


Figure 107 : Histogramme montrant les moyennes des nombres de spots de paxilline par unité de surface ( $\mu\text{m}$ ) des myoblastes par cellule pour des rats WT et DMD suivant l'âge (mois). Sur le graphique chaque symbole représente un rat unique. Le nombre de n indique le nombre de rats évalués.

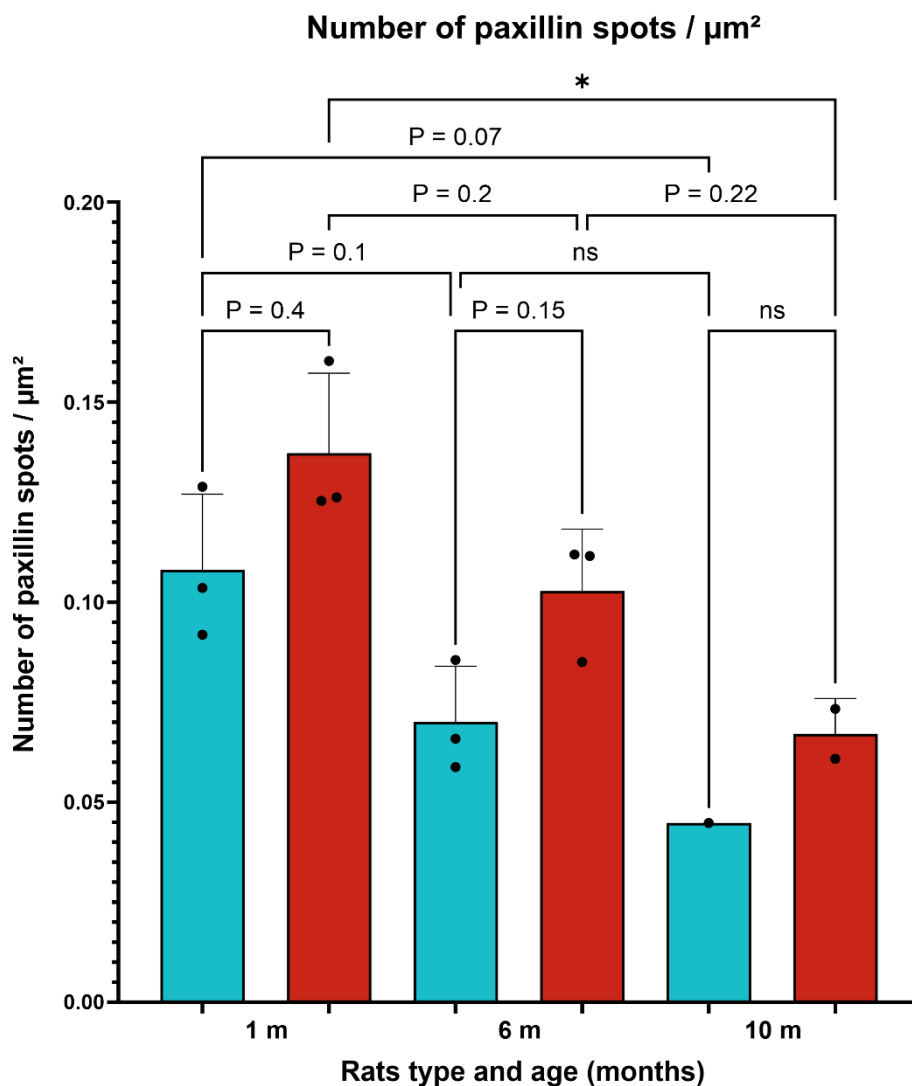


Figure 108 : Histogramme montrant les moyennes des nombres de spots de paxilline pas unité de surface ( $\mu\text{m}$ ) des myoblastes par rat WT et DMD suivant l'âge (mois).

Les résultats obtenus montrent que le nombre de spots de paxilline par micromètre est globalement plus grand chez les myoblastes DMD que chez les WT. Cette différence est de 34% et 47% pour les rats d'1 mois et 6 mois respectivement.

Nous constatons également que le nombre de spots par micromètre diminue au cours de l'âge pour les myoblastes WT et DMD. Cette diminution entre 1 mois et 10 mois est de  $\approx 60\%$  que ce soit pour les rats WT ou DMD.

#### 2.2.6. *Moyenne de la taille des spots de paxilline :*

Le dernier paramètre que nous avons étudié est la taille des spots de paxilline. Les résultats sont affichés dans le Tableau 20 et les Figure 109 et Figure 110.

Tableau 20 : Tableau regroupant les statistiques descriptives concernant la taille moyenne des spots de paxilline des myoblastes WT et DMD.

Type et âges de rats (mois)	WT-1	DMD-1	WT-6	DMD-6	WT-10	DMD-10
Nombre de cellules	33	43	33	31	12	21
Minimum ( $\mu\text{m}^2$ )	0.1300	0.1320	0.1030	0.1620	0.1100	0.1280
Maximum ( $\mu\text{m}^2$ )	0.6020	0.5010	0.6740	0.6360	0.4480	0.7790
Moyenne ( $\mu\text{m}^2$ )	0.3127	0.2690	0.3228	0.4259	0.2477	0.3781
Ecart-type ( $\mu\text{m}^2$ )	0.1252	0.08962	0.1678	0.1225	0.09591	0.1963
Erreur type de la moyenne ( $\mu\text{m}^2$ )	0.02180	0.01367	0.02921	0.02200	0.02769	0.04284

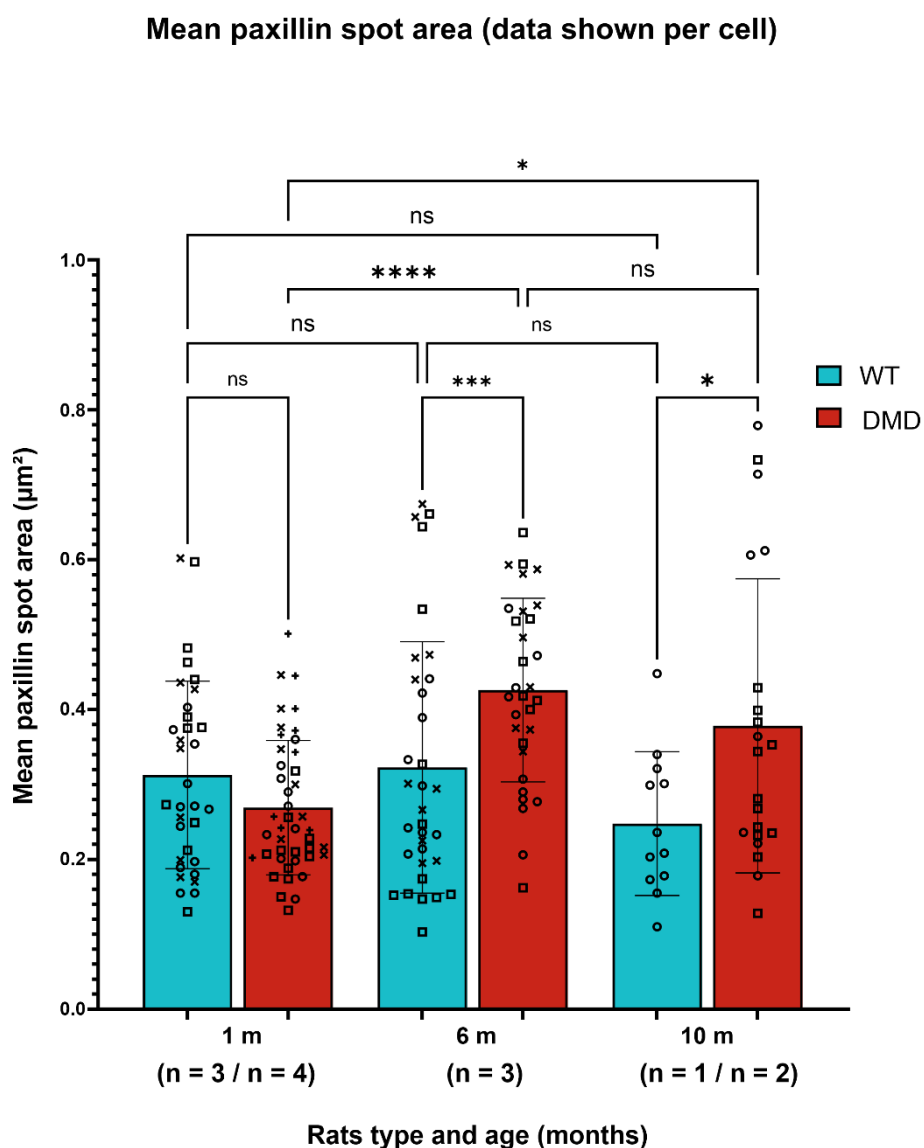


Figure 109 : Histogramme montrant les moyennes de tailles des spots de paxilline des myoblastes par cellule pour des rats WT et DMD suivant l'âge (mois). Sur le graphique chaque symbole représente un rat unique. Le nombre de n indique le nombre de rats évalués.

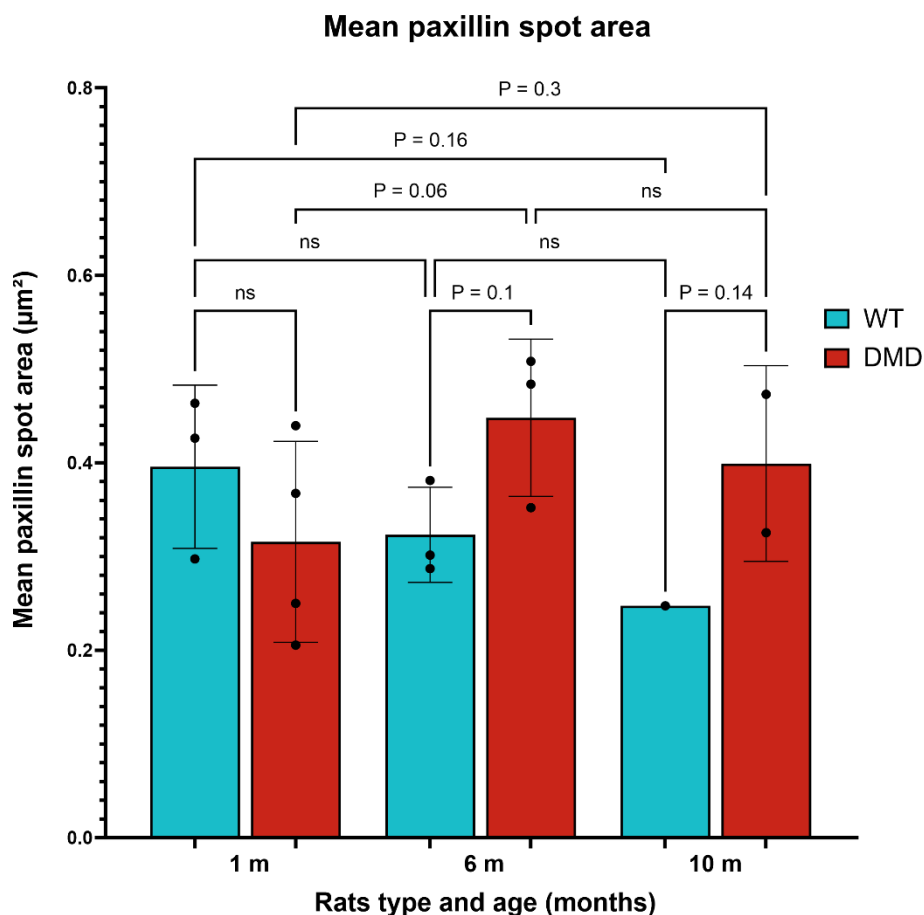


Figure 110 : Histogramme montrant les moyennes de la moyenne de taille des spots de paxilline des myoblastes par rat WT et DMD suivant l'âge (mois).

Ces résultats montrent une très faible différence entre les myoblastes WT et DMD sur l'ensemble des âges. Cette différence est légèrement plus prononcée à 6 mois avec une différence de 32% ( $p = 0.1$ ).

Les résultats des deux paramètres suivants, à savoir le nombre de spots de paxilline par  $\mu\text{m}^2$  et la taille moyenne des spots de paxilline, indiquent globalement des valeurs plus élevées chez les myoblastes DMD que chez les myoblastes WT. De plus, ces résultats sont similaires à ceux obtenus pour le nombre de spots de paxilline par myoblaste. Ces observations soutiennent l'hypothèse d'une possible régulation positive de la paxilline chez les rats DMD, suggérant un rôle potentiel dans la stabilisation structurelle et l'adhérence en compensation d'un complexe dystroglycan non fonctionnel (Sen et al., 2011).

### 2.3. Analyse des gènes des myoblastes :

Conformément au protocole décrit dans la section Matériels et méthodes, nous avons réalisé une analyse permettant d'identifier les gènes surexprimés dans les myoblastes WT et les myoblastes DMD. Les résultats de cette analyse ont été présentés sous la forme d'une heatmap,

représentée dans la Figure 111. Les gènes surexprimés chez les myoblastes DMD sont indiqués à droite de la heatmap, représentés en vert, tandis que les gènes surexprimés chez les myoblastes WT sont indiqués à gauche de la heatmap, représentés en rouge.

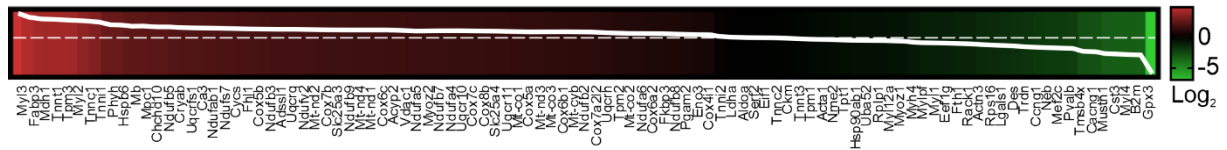


Figure 111 : Heatmap des différents gènes surexprimés et sous-exprimés chez les myoblastes DMD comparé aux myoblastes WT. Le vert représentant une surexpression chez les myoblastes DMD et le rouge représentant une sous-expression.

Parmi les gènes identifiés, ceux ayant une significativité supérieure à un seuil défini (représenté par \*\*) ont été sélectionnés. Des investigations ont été menées pour déterminer leur localisation cellulaire, les processus biologiques dans lesquels ils sont impliqués, ainsi que leur classe de protéines. Ces informations sont présentées dans les Tableau 22 et Tableau 24, tandis que la nomenclature des gènes est détaillée dans les Tableau 21 et Tableau 23. Il convient de noter que notre intérêt principal s'est porté sur les gènes codant pour les protéines du cytosquelette, comme mentionné précédemment.

Tableau 21 : Tableau des nomenclatures des gènes surexprimés chez les myoblastes WT.

MyI3	Myosin light chain 3
Fabp3	Fatty acid-binding protein, heart
Mdh1	Malate dehydrogenase, cytoplasmic
Tnnt1	Troponin T, slow skeletal muscle
Tpm3	Tropomyosin alpha-3 chain
MyI2	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform
Tnnc1	Tnnc1: Cardiac troponin C
Tnni1	Troponin I, slow skeletal muscle
Phyh	Phytanoyl-CoA dioxygenase, peroxisomal
Hspb6	Heat shock protein beta-6
Mb	Myoglobin
Mpc1	Mitochondrial pyruvate carrier 1
Chchd10	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10
Ndufb5	Complex I-SGDH

Dans le Tableau 22, qui présente les gènes surexprimés chez les myoblastes WT et sous-exprimés chez les myoblastes DMD, nous observons que les gènes codant pour les protéines myosine à chaîne légère 2 et 3 (MyI2, MyI3), la tropomyosine alpha-3 (Tpm3), ainsi que les troponines T, C et I (Tnnt1, Tnnc1, Tnni1), sont sous-exprimés chez les myoblastes DMD. Ces gènes sont mis en évidence en bleu dans la Figure 112. Comme indiqué dans la section Introduction, ces protéines jouent un rôle crucial dans la migration des myoblastes, dans leur



différenciation en régulant la formation de l'appareil contractile, ainsi que dans le fonctionnement de la contraction dans les fibres musculaires.

Tableau 22 : Tableau indiquant les gènes surexprimés chez les myoblastes WT, leur taux de variation en échelle logarithmique, les processus biologiques dans lesquels ils sont impliqués, leur type d'élément cellulaire et leur classe de protéine.

Gene	MyI3	Fabp3	Mdh1	Tnnt1	Tpm3	MyI2	Tnnc1	Tnni1	Phyh	Hspb6	Mb	Mpc1	Chchd10	Ndufb5
WT Log2 Fold Change	4.57	3.97	3.62	3.61	3.59	3.54	3.12	2.83	2.32	2.30	2.08	2.07	1.97	1.97
P-Value	****	****	****	****	****	****	****	***	****	***	****	***	***	***
Count	3	3	3	6	4	6	5	4	1	3	2	0	2	3
Biological Process	Cellular process			x	x	x	x			x			x	
	Biological regulation							x						
	Developmental process				x		x							
	Multicellular organismal process				x	x	x	x	x					
	Metabolic process			x										
	Localization		x									x		
Response to stimulus										x				
Cellular Component	Cellular anatomical entity	x	x		x	x	x	x	x				x	x
	Protein-containing complex	x			x		x	x	x					x
Protein Class	Cytoskeletal protein	x			x	x	x	x	x					
	Metabolite interconversion enzyme			x						x				x
	Transfer/carrier protein		x								x			
	Chaperone									x				

Le Tableau 24 présente les gènes surexprimés chez les myoblastes DMD. Parmi ces gènes, on retrouve la myosine à chaîne légère 4 (MyI4), la nébuline et la desmine. Comme le montre également la Figure 112 et comme cela est mentionné dans la section Introduction, les protéines codées par ces gènes jouent un rôle crucial dans les myoblastes. Par exemple, la nébuline sert d'échafaudage à l'actine pour former l'appareil contractile lors de la différenciation, tandis que la desmine régule les propriétés viscoélastiques du myoblaste ainsi que l'adhérence et la vitesse de migration. Cependant, ces protéines ne semblent pas avoir d'impact sur la fonction de prolifération des myoblastes (Charrier et al., 2018; Hakibilen et al., 2022).

Tableau 23 : Tableau des nomenclatures des gènes surexprimés chez les myoblastes DMD

Gpx3	Glutathione peroxidase 3
B2m	Beta-2-microglobulin
Myl4	Myosin light chain 4
Cst3	Cystatin-C
Mustn1	Musculoskeletal, embryonic nuclear protein 1
Cacng1	Voltage-dependent calcium channel gamma-1 subunit
Tmsb4x	Thymosin beta-4
Pvalb	Parvalbumin alpha
Mef2c	Myocyte-specific enhancer factor 2C
Neb	Nebulin
Ccng1	Cyclin-G1
Trdn	Triadin
Des	Desmin

Tableau 24 : Tableau indiquant les gènes surexprimés chez les myoblastes DMD, leur taux de variation en échelle logarithmique, les processus biologiques dans lesquels ils sont impliqués, leur type d'élément cellulaire et leur classe de protéine.

Gene	Gpx3	B2m	Myl4	Cst3	Mustn1	Cacng1	Tmsb4x	Pvalb	Mef2c	Neb	Ccng1	Trdn	Des
<b>DMD Log2 Fold Change</b>	6.56	3.05	3.01	2.98	2.97	2.57	2.51	1.96	1.91	1.90	1.81	1.67	1.54
<b>P-Value</b>	****	****	****	****	****	****	***	***	***	**	***	**	**
<b>Count</b>	1	9	3	2	0	5	6	2	6	5	7	0	4
<b>Biological Process</b>	Cellular process	x				x	x		x	x	x		
	Biological regulation		x			x	x		x		x		
	Developmental process								x	x			x
	Multicellular organismal process								x	x			x
	Metabolic process		x						x		x		
	Localization						x				x		
	Response to stimulus		x										
	Biological adhesion		x										
	Locomotion						x						
	Immune system process		x										
<b>Cellular Component</b>	Cellular anatomical entity	x	x	x		x	x	x		x	x		x
	Protein-containing complex		x	x		x					x		
<b>Protein Class</b>	Cytoskeletal protein			x			x			x			x
	Protein-binding activity modulator				x						x		
	Defense/immunity protein		x										
	Transporter					x							
	Gene-specific transcriptional regulator								x				
	Calcium-binding protein							x					
	Metabolite interconversion enzyme	x											

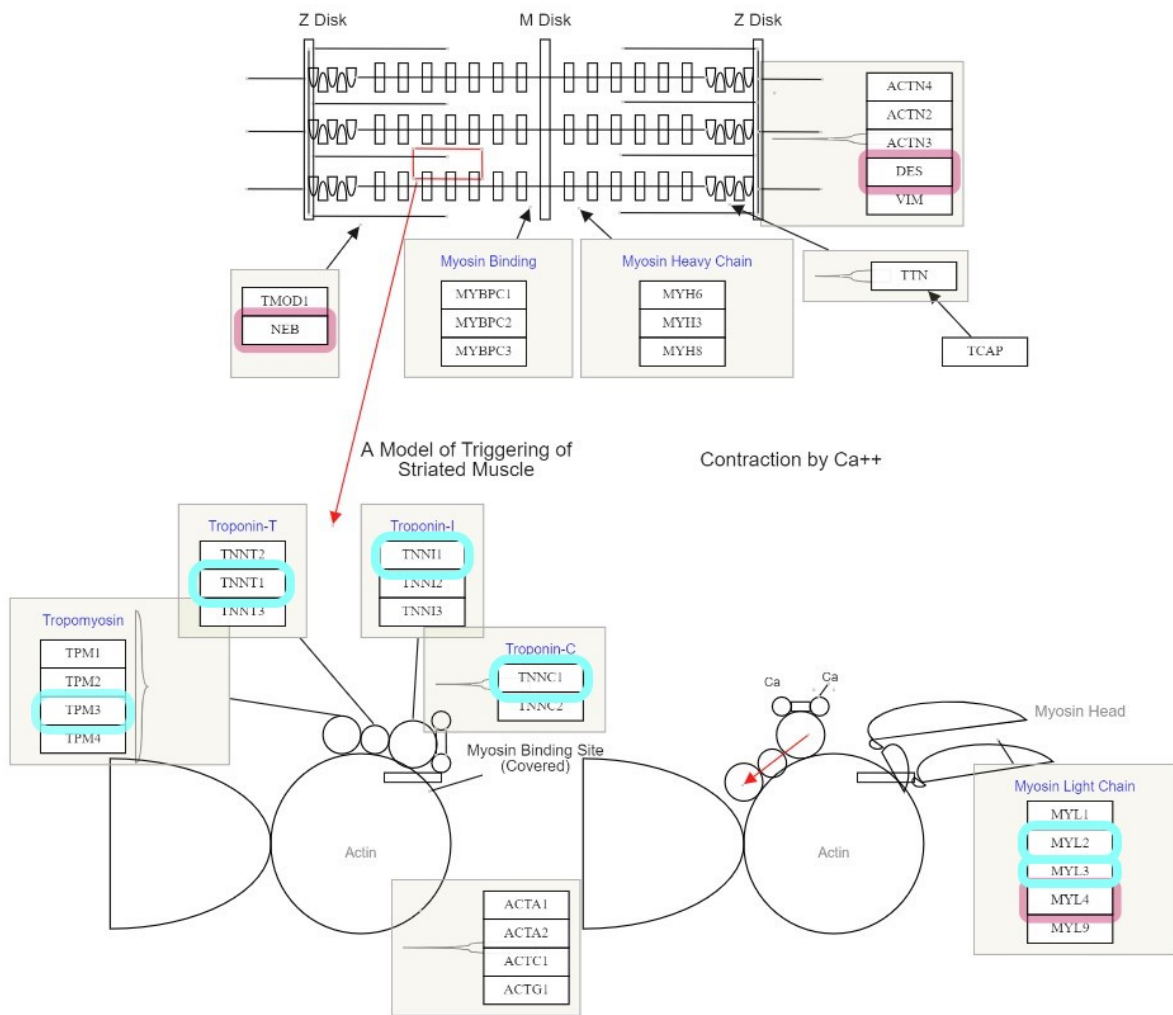


Figure 112 : Schéma représentant les gènes sous-exprimés (en bleu) et des gènes surexprimés (en rouge) pour le phénotype DMD dans la voie de contraction du muscle strié. (<https://www.ndexbio.org/>)

L'analyse de l'expression des gènes a été menée sur des myoblastes WT et DMD de 12 mois. Une partie des protéines codées par les gènes en sous-expression ou en surexpression dans les myoblastes s'avère jouer un rôle important notamment dans la voie de contraction du muscle strié. Bien que des analyses de l'expression génique aient été réalisées précédemment sur les myoblastes, une étude plus approfondie de ces gènes et de leur régulation dans les fibres musculaires du muscle strié pourrait fournir des informations supplémentaires sur leur rôle dans la pathogenèse de la maladie.

Ainsi, en transposant les résultats obtenus sur l'expression des gènes dans les myoblastes à la voie de contraction des fibres musculaires striées, certaines observations peuvent être faites concernant les protéines dont les gènes sont sous-exprimés ou surexprimés dans le phénotype DMD (Voir Figure 112).

Premièrement, les protéines associées à la régulation de la contraction musculaire, telles que la tropomyosine 3 (TMP3) et les sous-unités de la troponine (TNNT1, TNNT2, TNNT3), sont sous-exprimées dans le phénotype DMD. Cela suggère une altération potentielle de la régulation de la liaison entre les filaments d'actine et de myosine, ce qui peut avoir un impact sur la capacité des fibres musculaires à se contracter efficacement.

Deuxièmement, la surexpression de la nébuline et de la desmine dans le phénotype DMD indique leur rôle potentiel dans la compensation des altérations structurelles et mécaniques observées dans les fibres musculaires DMD. La nébuline agit comme un échafaudage pour l'assemblage du sarcomère et régule les interactions actine-myosine, tandis que la desmine est impliquée dans le maintien de l'architecture cellulaire, la transmission de la force et la fonction mitochondriale.

Enfin, les chaînes légères de myosine (MYL2, MYL3) sont sous-exprimées dans le phénotype DMD, tandis que la chaîne légère de myosine 4 (MYL4) est surexprimée. Cette altération de l'expression des chaînes légères de myosine peut affecter la fonction de contraction des muscles squelettiques.

#### 2.4. Expression de la protéine desmine par Western Blot :

Nous avons quantifié l'expression de la protéine desmine dans les muscles EDL de rats WT et DMD âgés de 6 mois (n = 3 et n = 4 respectivement) en utilisant la méthode du western blot, comme décrit dans la section Matériels et méthodes. Étant donné l'importance de la desmine dans la structure et les propriétés mécaniques des fibres musculaires, ainsi que sa surexpression dans les myoblastes DMD, nous avons entrepris cette quantification.

Les résultats présentés dans la Figure 113 confirment une augmentation de l'expression de la protéine desmine dans les muscles DMD. Comme nous l'avons mentionné précédemment dans l'introduction et dans les résultats, cette surexpression pourrait potentiellement moduler la réponse élastique et viscoélastique des fibres musculaires atteintes de DMD.

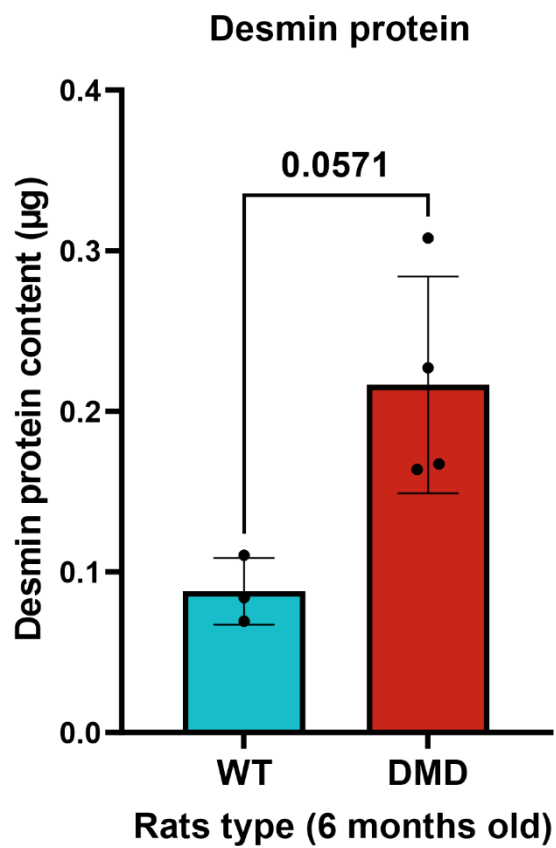


Figure 113 : Histogramme des moyennes d'expression de la protéine desmine dans des muscles EDL WT et DMD. La quantification de la protéine a été faite par la technique du western blot.

# Discussion

En marge de l'étude principale qui porte sur la caractérisation de la DMD par la mécanique, ce manuscrit comporte une réflexion sur l'outil AFM dédiée à l'amélioration de l'analyse des données issues de la microscopie AFM. Ne constituant pas le cœur de ce travail, cette étude commencée au cours de mon stage de Master 2 et finalisée durant la thèse, est présentée en Annexes sous la forme d'un article prêt à être soumis.

L'AFM implique l'indentation d'un échantillon biologique par une sonde qui, dans notre cas, est de forme pyramidale. Les courbes de spectroscopie de force collectées lors de ces mesures expérimentales sont analysées en utilisant la loi classique de Hertz donnée pour la pointe pyramidale. Cette loi permet de calculer le module d'élasticité de l'échantillon biologique en utilisant les mesures de la force et de l'indentation.

Rappelons que la loi de Hertz, utilisée dans l'analyse des courbes de spectroscopies AFM, suppose que la surface de l'échantillon soit parfaitement plane et que l'indenteur soit perpendiculaire à cette surface. Cependant, dans le cas des cellules ou d'autres échantillons biologiques, il n'est pas rare que la surface de contact avec la sonde AFM présente une courbure locale qui peut moduler la mesure de la force d'indentation et donc influencer le module d'élasticité calculé. Ainsi, nous avons entrepris une évaluation de l'impact de la configuration géométrique du système sur la détermination du module d'élasticité par AFM, en mettant spécifiquement l'accent sur l'effet de l'angle d'inclinaison de la surface de l'échantillon. Grâce à une analyse qui couple une approche théorique, une approche numérique via des simulations numériques et une approche expérimentale basée sur l'utilisation des gels de polyacrylamide, nous mettons en évidence non seulement l'effet de l'angle d'inclinaison sur le module d'élasticité mais aussi, qu'au-delà d'un certain angle d'inclinaison, d'autres paramètres sont à prendre en compte dans l'estimation du module de Young par AFM, tels que des paramètres géométriques et une plus grande complexité mécanique du système. Pour les inclure dans les mesures par AFM, nous proposons une correction de la loi de Hertz basée sur l'ajout de coefficients correctifs qui permettent de tenir compte des écarts par rapport à l'hypothèse classique de la surface plane. Deux coefficients de correction ont été établis pour les principales sondes couramment utilisées dans les mesures AFM des matériaux biologiques à savoir les sondes pyramidales et les sondes sphériques. Cette correction permet d'obtenir des valeurs de module d'élasticité plus fiables à partir des données AFM. En corrigeant l'équation classique de Hertz, ce travail contribue à améliorer la qualité des mesures de caractérisation des matériaux biologiques par AFM et notre compréhension de leurs propriétés mécaniques.

Dans ce qui suit, la discussion est divisée en deux parties. Dans la première partie de notre chapitre de discussion, nous présenterons et discuterons des résultats de nos expériences menées à l'aide de la microscopie à force atomique (AFM) et de l'élastographie ultrasonore. L'objectif de ces expériences était d'évaluer l'impact de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) sur les propriétés élastiques et viscoélastiques à différentes échelles, allant du niveau du myoblaste au niveau du muscle dans son ensemble, ainsi qu'à différents stades de l'évolution de la maladie.

Dans la deuxième partie, nous avons examiné les résultats de nos expériences réalisées sur des myoblastes provenant de rats WT et DMD âgés de 1, 6 et 10 mois. Nous avons principalement utilisé des données obtenues par imagerie confocale et vidéomicroscopie pour évaluer la structure mais également deux fonctions cellulaires cruciales : la migration et la prolifération. Ces fonctions sont d'une grande importance dans les processus de régénération et sont étroitement liées au cytosquelette cellulaire. Notre objectif est d'évaluer l'impact de la DMD et de son évolution sur ces deux fonctions cellulaires clés notamment à travers les changements structurels du myoblaste.

## 1. Impact de la DMD sur les propriétés mécaniques

Dans cette section, les données des propriétés mécaniques des myoblastes, myotubes, fibres musculaires et muscle de rat WT et DMD ont été combinées afin d'analyser de façon plus globale les évolutions temporelles et multi-échelles de ces propriétés mécaniques. Cela permet de réaliser un récapitulatif de la différence de rigidité entre les WT et les DMD suivant les échelles biologiques du muscle et les âges de rats. Dans cette partie, nous mettons en avant également notre hypothèse de continuum mécanique entre les échelles.

Les Figure 114 et Figure 115 présentent des histogrammes montrant l'ensemble des modules d'élasticité obtenus pour les rats WT et DMD respectivement, à travers les différentes échelles biologiques et les différents âges. Chaque barre de chaque histogramme des Figure 114 et Figure 115 représente la moyenne d'un module d'élasticité mesuré pour chaque âge à chaque échelle. Ces histogrammes permettent d'une part de visualiser les valeurs de rigidité et d'appréhender les variations de ces valeurs selon les paramètres étudiés pour un phénotype de rat donné et d'autre part de comparer la distribution des valeurs de rigidité entre les rats WT et DMD à différentes échelles et âges.



Pour mieux discerner les variations de rigidité en fonction des différentes échelles biologiques et des âges des rats, et pour faciliter la comparaison de ces variations de rigidité en fonction du phénotype du rat, une méthode de visualisation a été employée. Plus précisément, un code couleur a été utilisé, accompagné de lignes reliant les sommets de chaque colonne correspondant au même âge des rats. Les rats d'1 mois ont été représentés avec des lignes continues et des colonnes en bleu ciel, les rats de 6 mois avec des lignes discontinues et des colonnes en bleu, et les rats de 10 mois avec des lignes en pointillés et des colonnes en bleu-violet.

Il faut noter que les valeurs des modules d'élasticité des muscles ont été prises à partir de la position neutre (position 2). En utilisant la position neutre comme référence, il est possible de mieux évaluer les variations de rigidité liées à d'autres facteurs, tels que l'échelle biologique et l'âge, en minimisant les effets de la position du muscle.

La Figure 114 semble montrer des variations de rigidité en fonction de l'échelle biologique et de l'âge. Pour l'échelle du myoblaste, du myotube et de la fibre musculaire, la rigidité semble augmenter entre 1 mois et 6 mois, puis diminuer à 10 mois. Cependant, pour les muscles dans leur ensemble, la tendance est différente, avec une diminution de la rigidité à 6 mois suivie d'une augmentation à 10 mois.

Ces résultats suggèrent que, au cours de la croissance et du vieillissement, les propriétés mécaniques des différentes échelles cellulaires du muscle (myoblaste, myotube, fibre musculaire) peuvent évoluer de manière distincte en comparaison avec les propriétés mécaniques des muscles dans leur ensemble.

Nous observons également une tendance exponentielle dans l'évolution de la rigidité à travers les échelles jusqu'à l'échelle de la fibre pour les trois groupes d'âge. Cependant, cette tendance n'est plus aussi prononcée lorsque nous passons à l'échelle du muscle, en particulier chez les rats de 6 mois. En effet, au passage à cette échelle biologique il y a une rupture dans l'accroissement de la rigidité qui diffère de celui observé aux autres échelles. Ceci peut s'expliquer partiellement par le fait que le muscle est une structure complexe et multi-échelle, composée de différentes sous-structures. Ainsi, la rigidité du muscle ne dépend pas uniquement de la rigidité des fibres musculaires qui le composent, mais également de leur organisation, de leur taille, ainsi que de la composition de la matrice extracellulaire (fibrose, graisse, inflammation, etc.), de sa rigidité et de sa proportion volumique dans le muscle (Creze et al.,

2018; Guan et al., 2015; Howard, 2001). Une autre observation mise en évidence par Lima et ses collègues est que la rigidité des muscles n'est pas corrélée à l'âge (e Lima et al., 2018).

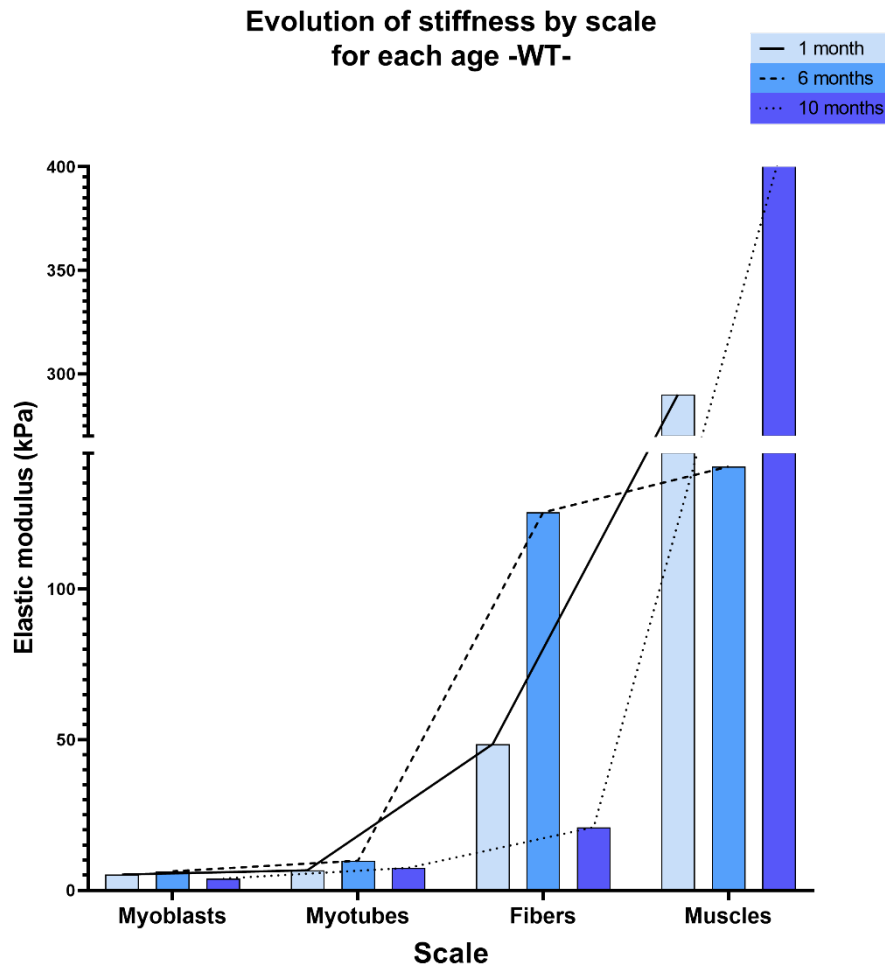


Figure 114 : Histogramme de l'évolution de la rigidité par échelle pour chaque âge de rat WT.

Dans le cas des rats DMD, nous avons également observé une évolution similaire à celle des rats WT. Sur la Figure 115, nous constatons que la rigidité augmente de 1 mois à 6 mois pour les échelles des myotubes et des fibres, puis diminue à 10 mois. Cependant, cette tendance est moins marquée pour l'échelle des myoblastes en raison de la rigidité plus élevée des myoblastes DMD à 1 mois, comme le montre la Figure 72. Afin de mieux comprendre ce résultat, une étude de la structure de ces myoblastes a été réalisée, et nous aborderons cette question plus en détail dans la suite de ce chapitre.

En ce qui concerne le muscle DMD, nous constatons également que sa rigidité ne suit pas la tendance observée pour les autres échelles biologiques. Au contraire, nous observons une baisse significative de la rigidité du muscle avec l'âge chez les rats DMD.

L'analyse de l'évolution de la rigidité selon les différentes échelles biologiques (myoblaste, myotube, fibre) montre des résultats relativement similaires à ceux observés pour les rats WT, à savoir une évolution à tendance exponentielle de la rigidité. Cependant, cet accroissement d'allure exponentiel est perdu lorsque nous incluons dans l'analyse les valeurs des rigidités à l'échelle du muscle.

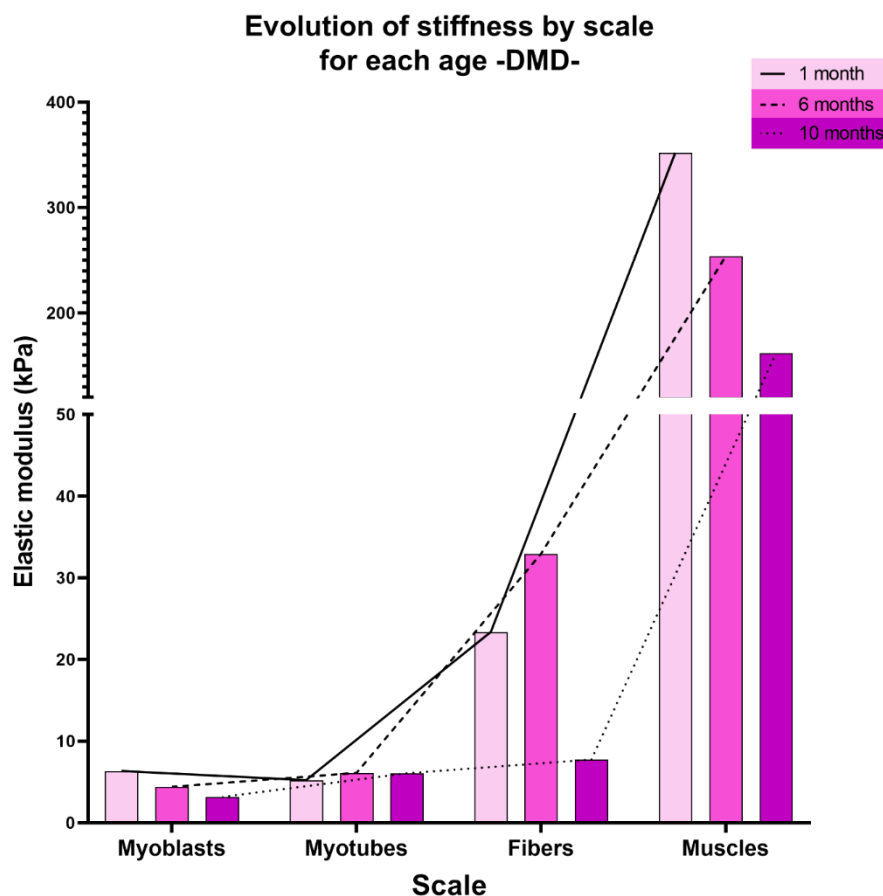


Figure 115 : Histogramme de l'évolution de la rigidité par échelle biologique pour chaque âge de rat DMD.

Pour tester la fiabilité de notre hypothèse selon laquelle la rigidité augmente suivant une tendance exponentielle entre les échelles biologiques (myoblaste-myotube-fibre) indépendamment de l'âge, nous avons représenté les différentes valeurs de rigidité sur un graphique avec pour l'axe des ordonnées une échelle logarithmique en base 10 et en abscisses les différentes échelles biologiques prises arbitrairement comme des unités (myoblastes = 1 ; myotubes = 2 ; fibres = 3). Ensuite, nous avons ajusté les valeurs de chaque âge en utilisant des

lois exponentielles. Cette méthode a été appliquée aux résultats des rats WT (Figure 116.a) et des rats DMD (Figure 116.b) afin de les comparer.

Les résultats obtenus suggèrent effectivement l'existence d'un continuum mécanique entre les différentes échelles du muscle, indépendamment de l'âge ou du type de rat. Cependant, il est également remarqué que la présence de la DMD perturbe cette augmentation et rend l'ajustement de la tendance exponentielle moins précis pour les rats atteints de la DMD par rapport aux rats WT. En effet, la moyenne des carrés du coefficient de corrélation pour les différents âges est de 0.89 pour les rats WT et de 0.82 pour les rats DMD. Cela indique que la DMD peut altérer les propriétés mécaniques et l'évolution du continuum mécanique à travers les échelles biologiques du muscle.

De plus, les exposants des lois exponentielles, qui correspondent aux pentes dans le graphique semi-logarithmique, ont été calculés et sont indiqués en rouges (voir Figure 116). Il est observé que ces exposants sont plus élevés chez les rats WT que chez les rats DMD, indépendamment de l'âge. En effet, les valeurs de ces exposants sont presque deux fois plus élevées chez les rats WT par rapport aux rats DMD à chaque tranche d'âge (0.83 vs 0.43 pour 1 mois, 1.12 vs 0.65 pour 6 mois et 1.49 vs 1 pour 10 mois). Ces résultats démontrent que l'accroissement des rigidités à travers les échelles biologiques est plus prononcé chez les rats WT que chez les rats DMD.

Cette observation peut être également associée aux processus biologiques intervenant dans l'évolution, tels que les défauts de fusion des myoblastes en myotubes et les défauts de maturation des myotubes en fibres musculaires, qui sont observés dans le cas de la DMD. Il est plausible que les défauts biologiques et mécaniques au niveau des myoblastes entraînent des répercussions sur les myotubes et les fibres musculaires générées (Berendse et al., 2003). Ainsi, l'évolution des propriétés mécaniques peut être en accord avec l'évolution biologique, soulignant l'importance de comprendre ces interactions pour mieux appréhender les mécanismes de la DMD.

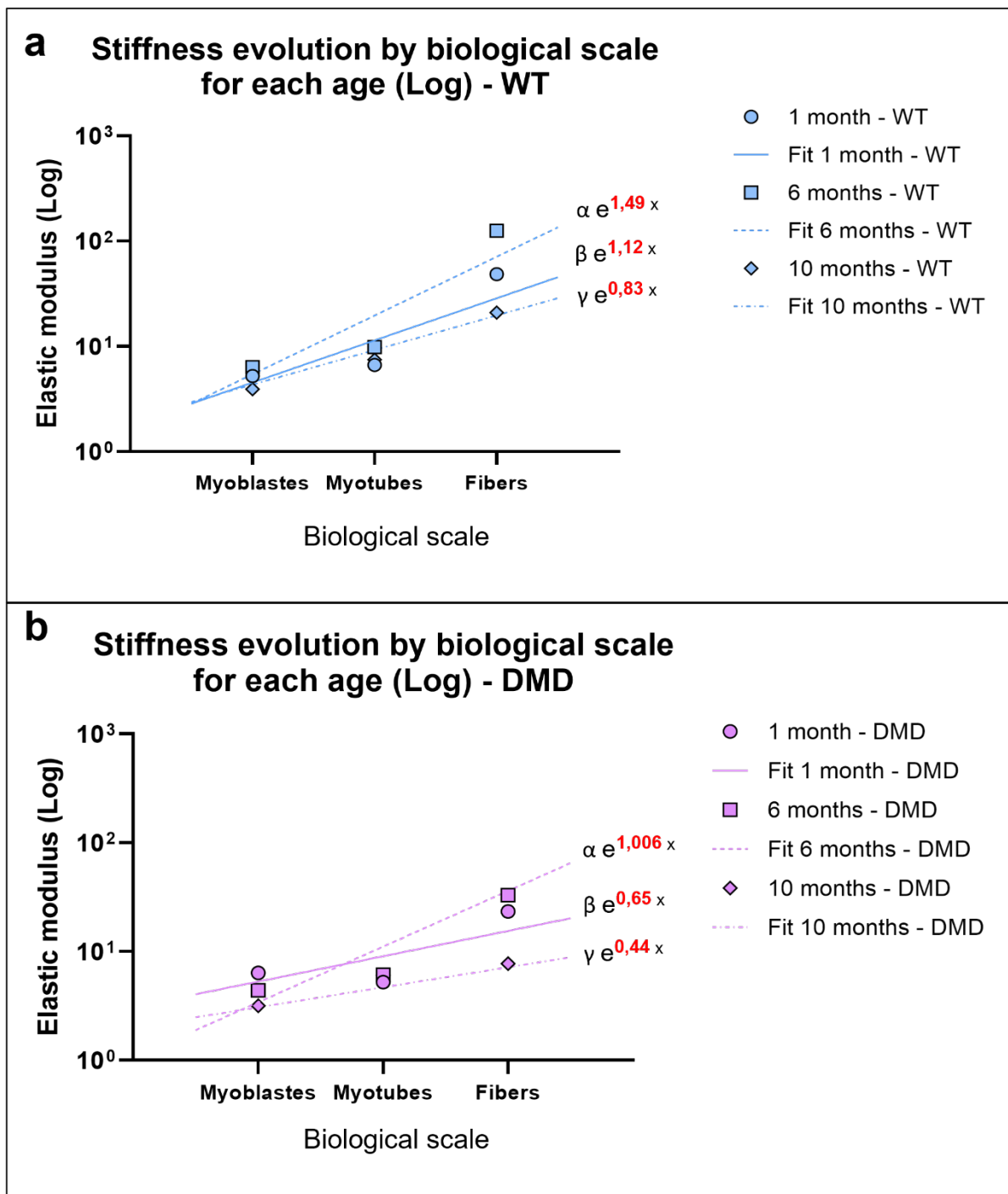


Figure 116 : Hypothèse d'un continuum mécanique. a. Rigidités des myoblastes, des myotubes et des fibres musculaires, à différents âges des rats WT, sont représentées sur un graphique semi-logarithmique, accompagnées des courbes d'ajustement exponentiel correspondantes. b. Rigidités des myoblastes, des myotubes et des fibres musculaires, à différents âges des rats DMD, sont représentées sur un graphique semi-logarithmique, accompagnées des courbes d'ajustement exponentiel correspondantes. Il est à noter qu'en abscisses les différentes échelles biologiques sont prises arbitrairement comme des unités (myoblastes = 1 ; myotubes = 2 ; fibres = 3).

En considérant notre concept de continuum mécanique entre les différentes échelles biologiques du muscle, ainsi que l'observation selon laquelle l'augmentation de la rigidité en fonction de

l'échelle biologique est moins marquée chez les rats atteints de DMD que chez les rats WT, nous avons jugé pertinent d'étudier les différences de valeurs de rigidité entre les modèles de rats WT et DMD.

Nous avons généré deux représentations graphiques pour étudier l'évolution de la différence de rigidité entre les modèles WT et DMD. La première représentation met en relation la différence de rigidité avec l'échelle biologique pour chaque âge, nous permettant d'observer comment cette différence varie au fil du temps. La seconde représentation met en relation la différence de rigidité avec les différents âges à chaque échelle biologique, nous permettant d'analyser comment cette différence varie selon l'échelle. Ces graphiques nous fournissent une vision globale de la variation de la rigidité entre les deux groupes à différents stades de développement et sur différentes échelles biologiques (Figure 117 et 118).

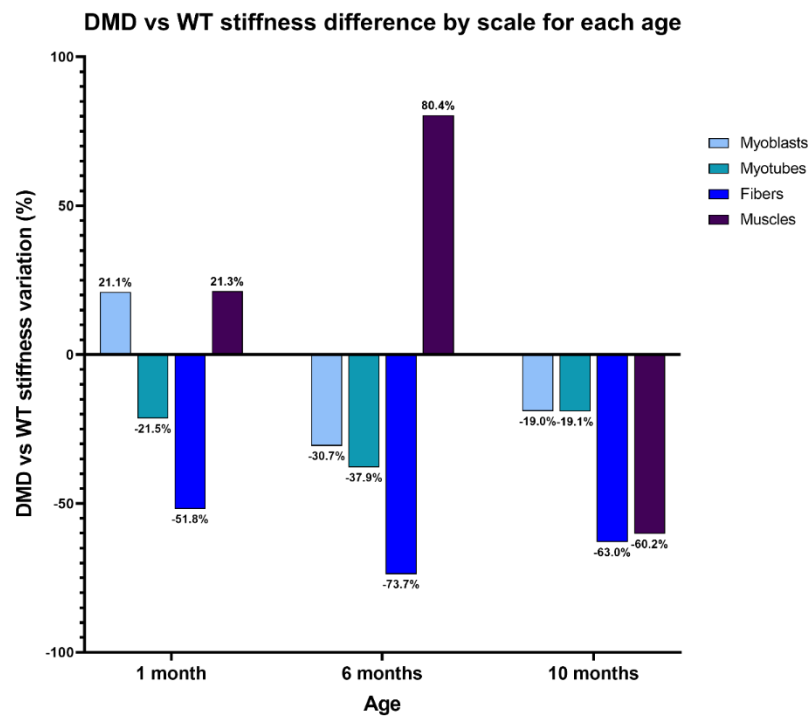


Figure 117 : Histogramme montrant les pourcentages de différence de rigidité entre les rats WT et DMD à différentes échelles biologiques pour chaque âge.

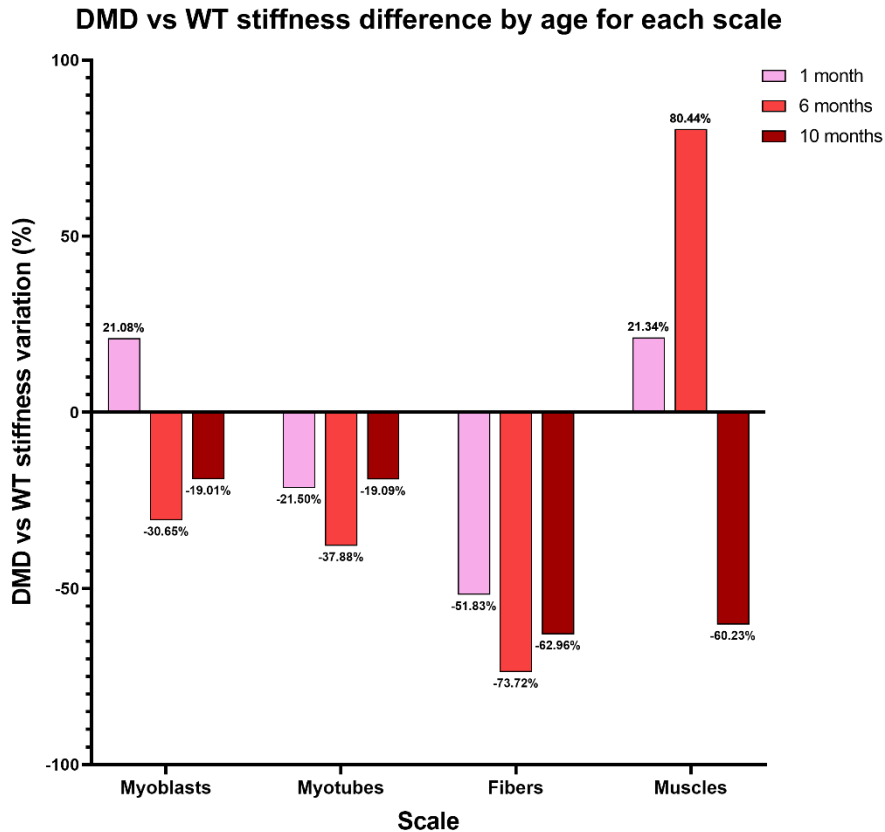


Figure 118 : Histogramme montrant les pourcentages de différence de rigidité entre les rats WT et DMD à différents âges pour chaque échelle biologique.

Sur la Figure 117, nous observons que la différence entre les modèles WT et DMD augmente en passant des myoblastes aux fibres musculaires, pour chaque tranche d'âge des rats. Cela confirme les résultats de la Figure 116.a. Cependant, cette augmentation de la différence n'est plus présente au passage à l'échelle du muscle dans son ensemble.

Nous remarquons également des différences dans les propriétés mécaniques à 1 mois (environ 21% pour les myoblastes, myotubes et muscles, et 52% pour les fibres), même si les symptômes de la DMD ne sont pas attendus à cet âge. De plus, cette différence est plus marquée à l'échelle des fibres musculaires.

Il est également intéressant de noter que les fibres musculaires présentent les différences les plus cohérentes et les plus prononcées par rapport aux autres échelles, même à un stade très précoce de la maladie (Figure 118).

Ces résultats suggèrent que les fibres musculaires sont le modèle le plus pertinent pour étudier la différence entre les rats WT et DMD, et qu'elles pourraient constituer un marqueur biomécanique pertinent de cette maladie et de l'efficacité des traitements proposés et ceci

indépendamment de l'âge. Cela peut s'expliquer par le fait qu'à l'échelle des fibres musculaires, au niveau structurel le cytosquelette est pleinement établi. En outre, il convient de souligner que les fibres musculaires matures présentent une expression significativement plus élevée de la dystrophine par rapport aux myoblastes et aux myotubes immatures. Par conséquent, l'absence de cette protéine, à l'échelle des fibres musculaires matures, a un impact considérablement plus prononcé.

Il est important de souligner que, contrairement à l'échelle du muscle dans son ensemble, l'influence de la rigidité de la matrice extracellulaire n'a pas à être considérée à l'échelle des fibres musculaires.

La Figure 118 montre que la différence de rigidité du muscle entre les rats WT et DMD évolue avec le temps. À 1 mois, il n'y a pas de différence notable, alors qu'à 6 mois, les muscles DMD sont nettement plus rigides, et à 10 mois, nous observons une inversion de la situation, avec des muscles WT plus rigides.

Des études menées sur des souris mdx ont permis de mieux comprendre le phénomène cité ci-dessus. Ces études indiquent que, bien que la fibrose (qui augmente avec l'âge dans la DMD) soit généralement associée à la rigidification des muscles (Stedman et al., 1991), ce n'est pas toujours le cas. En réalité, c'est plutôt l'alignement des fibres de collagène, composantes de la fibrose, qui régule la rigidité. Plus les fibres de collagène sont alignées, plus le tissu est rigide (S. E. Brashear et al., 2021; L. R. Smith et al., 2014). Dans notre modèle de rat R-DMDdel52, nous avons observé une faible quantité de fibrose à 3 semaines  $\approx$  1 mois (bien que toujours plus élevée que chez les rats WT), une augmentation de la fibrose à 6 mois, et une augmentation encore plus nette de celle-ci à 12 mois (Taglietti et al., 2022).

D'autre part, une autre étude menée sur des souris mdx a montré que l'alignement du collagène diminue entre 1 mois, 6 mois et 12 mois (Sarah E Brashear et al., 2022). Par conséquent, nous supposons que l'augmentation de la rigidité musculaire à 6 mois, suivie d'une baisse à 10 mois, est due au fait qu'à 6 mois, il existe une quantité importante de fibrose dans notre modèle rat DMD, mais que les fibres de collagène sont relativement alignées, ce qui a pour effet une augmentation la rigidité. Cependant, à 10 mois, l'augmentation de la fibrose et le désalignement complet des fibres de collagène entraînent une chute significative de la rigidité musculaire.

Sur la base de ces conclusions, nous recommandons d'inclure, dans les futures mesures de rigidité musculaire, des évaluations de la quantité et de l'alignement des fibres de collagène. Il



serait donc pertinent d'associer ces mesures aux évaluations de la rigidité, car l'alignement des fibres de collagène semble jouer un rôle clé dans la régulation de la rigidité musculaire.

Par ailleurs, en ce qui concerne les thérapies futures visant à traiter la fibrose, il serait peut-être pertinent d'agir sur la régulation de l'orientation des fibres de collagène aussi bien que sur la quantité de fibrose en elle-même. En influençant l'alignement des fibres de collagène, il pourrait être possible de moduler la rigidité des tissus musculaires de manière plus ciblée et efficace. Cela pourrait ouvrir de nouvelles perspectives pour le développement de thérapies visant à atténuer les effets délétères de la fibrose dans les maladies musculaires telles que la DMD.

Dans le cadre de la caractérisation mécanique, nous avons étendu le cadre de nos mesures en calculant les paramètres viscoélastiques à l'aide du modèle de Maxwell-Wiechert généralisé d'ordre deux pour trois échelles spécifiques : le myoblaste, le myotube et la fibre musculaire. La Figure 119 présente les courbes de contrainte normalisée en fonction du temps pour ces trois échelles, lesquelles ont été obtenues à partir des échantillons provenant de rats WT et DMD âgés d'1 mois et 6 mois. Ensuite, la Figure 120 illustre un histogramme qui met en évidence les variations de contraintes, exprimées en pourcentage, entre les instants  $t = 0$  s et  $t = 2$  s. Ces données sont calculées à partir des courbes de contrainte normalisée et représentent le pourcentage de relaxation.

La Figure 120, révèle que, pour toutes les échelles biologiques à 1 mois, correspondant à un stade précoce de la maladie, le pourcentage de relaxation, qui représente la diminution de la contrainte normalisée à 2 secondes, est sensiblement similaire entre les rats WT et les rats DMD. Ces résultats suggèrent que les propriétés viscoélastiques des échantillons à toutes les échelles biologiques sont relativement préservées et similaires à ce stade initial de la maladie.

Cependant, nous observons qu'à l'âge de 6 mois, les myoblastes et les fibres musculaires DMD présentent une relaxation plus marquée que les échantillons WT à 2 s. Cette observation renforce l'idée d'une altération des propriétés viscoélastiques dans la DMD.

Les résultats inverses observés pour les myotubes, où les échantillons WT présentent une relaxation plus importante que les échantillons DMD, peuvent être attribués au fait que les myotubes représentent une étape de différenciation transitoire entre les myoblastes et les fibres musculaires matures. Il est possible que cette différence de relaxation entre les échantillons WT et DMD soit liée au processus de différenciation des myoblastes en fibres musculaires matures, qui se produit pendant la formation des myotubes. Afin de mieux comprendre cette observation

et les mécanismes sous-jacents, des études complémentaires seraient nécessaires pour explorer plus en détail les caractéristiques viscoélastiques des myotubes WT et DMD.

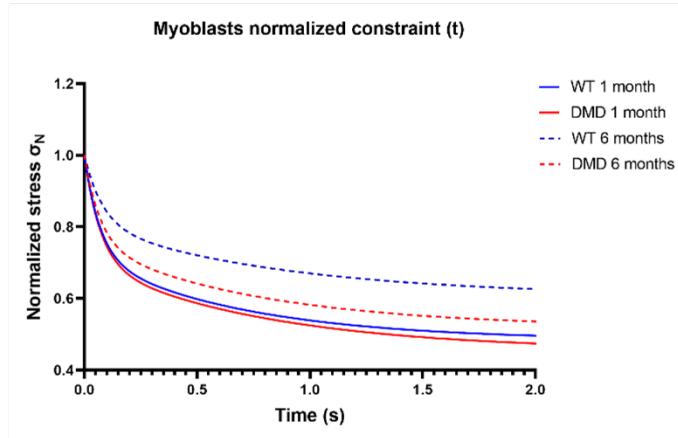
Nous avons également remarqué que le pourcentage de diminution de la contrainte normalisée est plus élevé pour les fibres musculaires DMD (24%) par rapport aux fibres musculaires WT (18%) à l'âge de 6 mois. De plus, nos résultats révèlent une surexpression de la desmine dans les fibres musculaires DMD à cet âge. Étant donné l'importance de la desmine en tant que composant clé du cytosquelette et les études antérieures qui ont démontré son rôle dans la réponse viscoélastique des myoblastes, nous formulons l'hypothèse que la desmine pourrait également jouer un rôle dans la réponse viscoélastique de nos fibres musculaires. Par conséquent, nous suggérons d'explorer cette piste par le biais d'études complémentaires afin de mieux comprendre le rôle mécanique et fonctionnel de la desmine, ainsi que son influence sur la réponse des fibres musculaires dans le contexte de la DMD.

Les résultats des propriétés viscoélastiques, tels qu'illustrés dans la Figure 120, révèlent que l'échelle des myoblastes à l'âge de 6 mois présente la plus grande différence entre les modèles WT et DMD. Comme nous l'avons déjà suggéré à la lumière des résultats obtenus sur l'élasticité, l'étude des myoblastes à 6 mois pourrait représenter un modèle pertinent pour les travaux de recherche portant sur la DMD, en incluant l'analyse des propriétés viscoélastiques. Cette échelle spécifique peut offrir des informations précieuses sur les altérations mécaniques et viscoélastiques associées à la maladie, ce qui pourrait contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes pathologiques et potentiellement guider le développement de nouvelles approches thérapeutiques.



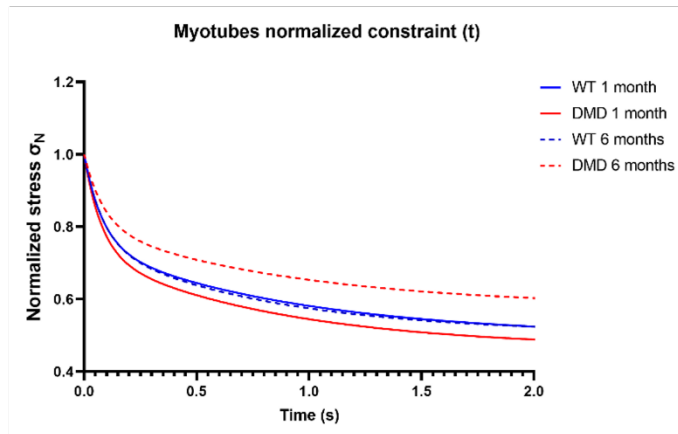
## Myoblasts

Normalized  
relaxation




## Myotubes

Normalized  
relaxation




## Muscle fibers

Normalized  
relaxation

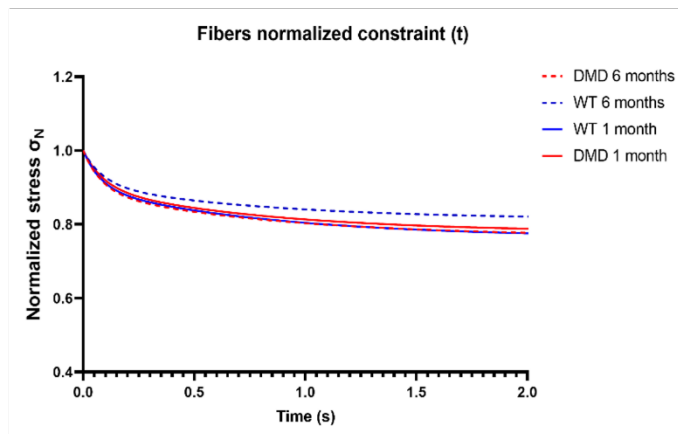


Figure 119 : Récapitulatif des courbes de contrainte normalisée pour les myoblastes, myotubes et fibres issus de rats WT et DMD d'1 mois et 6 mois.

## Percentage of relaxation at 2s for every group

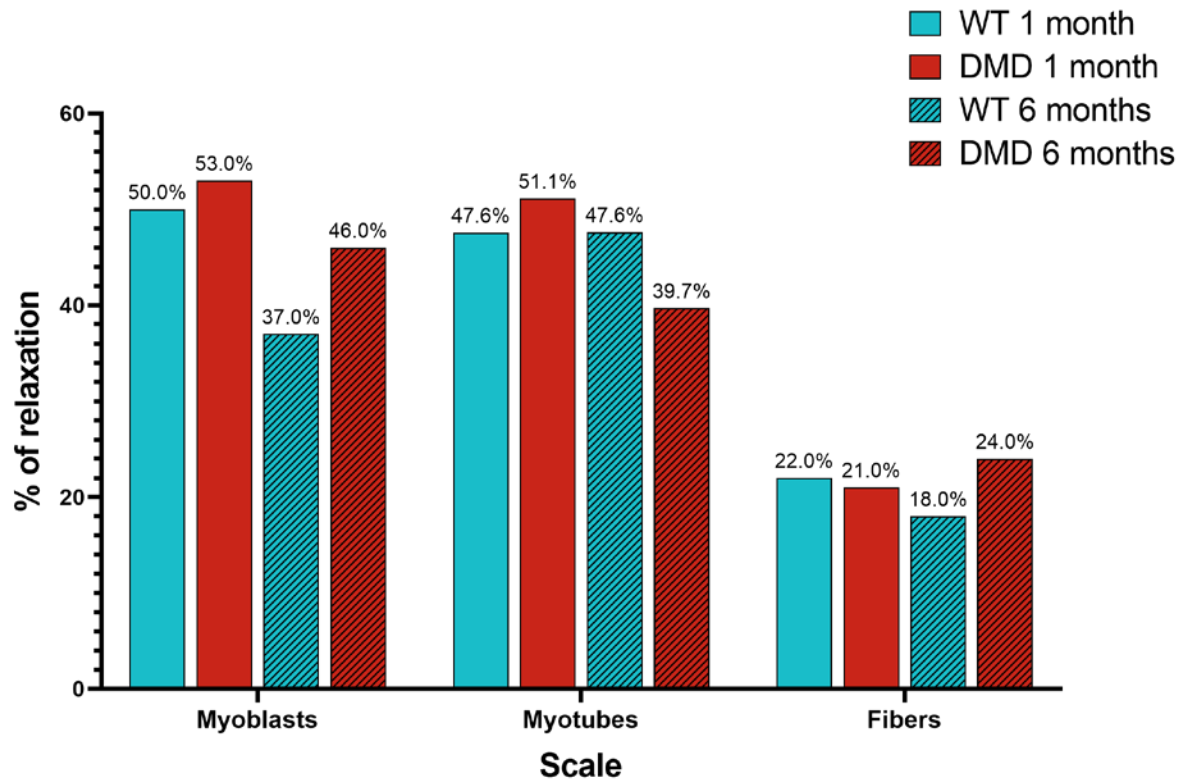


Figure 120 : Histogramme montrant les pourcentages de relaxation de la contrainte à 2s pour les myoblastes, myotubes et fibres issus de rats WT et DMD d'1 mois et 6 mois.

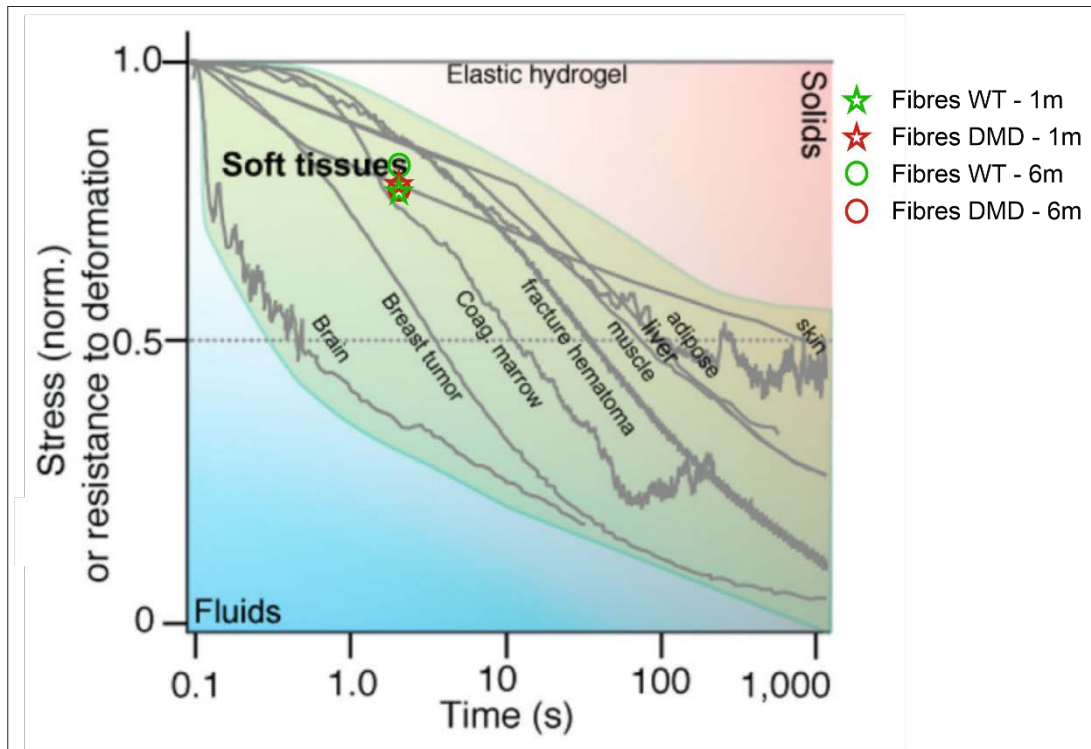


Figure 121 : Nous avons positionné sur un graphique, qui montre des relaxations normalisées, nos valeurs (à 2 secondes) pour les fibres de rats WT et DMD âgés de 1 mois (symbole étoile.) et 6 mois (symbole cercle.). On note que les courbes de relaxations normalisées sont obtenues à partir de diverses modalités de mesure (cisaillement, compression, tension), de divers outils de mesure (testeurs mécaniques, nanoindentation, AFM, rhéométrie de cisaillement) et de tissus d'origines animales différentes (humain, rat, souris, bovin, mouton, porcine, canin) (figure adaptée de (Chaudhuri et al., 2020)).

Afin de comparer nos résultats, nous avons représenté sur un graphique les valeurs normalisées de la contrainte relaxée à 2 secondes pour les fibres musculaires provenant de rats WT et DMD, âgés de 1 mois et de 6 mois (voir Figure 121). Ces valeurs sont rapprochées de différentes courbes de relaxation normalisée de tissus biologiques provenant de diverses sources dans la littérature (Chaudhuri et al., 2020). Les auteurs indiquent que les courbes de la Figure 121 représentent les résultats obtenus à partir de différentes modalités de mesure telles que le cisaillement, la compression et la tension, en utilisant divers outils de mesure tels que des testeurs mécaniques, la nanoindentation, l'AFM et la rhéométrie de cisaillement. De plus, les tissus utilisés dans ces études sont d'origines différentes (humain, rat, souris, bovin, mouton, porcine, canin).

Lors de la comparaison de nos données expérimentales sur les fibres musculaires isolées avec les données de la littérature, nous observons une cohérence globale entre ces deux ensembles de données. Plus précisément, nos résultats se situent juste en dessous de la courbe correspondant au muscle, en particulier pour la valeur correspondant au rat WT de 6 mois. Cela suggère que nos mesures sont en accord avec les tendances générales observées dans d'autres

études sur la viscoélasticité des tissus biologiques et de plus conforte la validité de nos mesures expérimentales de viscoélasticité par AFM.

Une revue des propriétés de rigidité à différentes échelles du muscle a été réalisée et incluse dans l'Introduction afin de comparer nos résultats à ceux des études précédentes menées par d'autres chercheurs. Cette revue a mis en évidence un large éventail de modules d'élasticité, qui varient en fonction de l'échelle biologique étudiée, du modèle animal utilisé, de l'âge du modèle, de la technique d'évaluation utilisée, des paramètres spécifiques de cette technique, ainsi que du muscle ciblé.

Au niveau des myoblastes, bien que les études répertoriées se soient principalement concentrées sur les lignées cellulaires C2C12, nous constatons que nos valeurs se situent dans la même plage. Cependant, il est important de souligner le manque notable d'études sur les myoblastes primaires dans la littérature scientifique. Plusieurs raisons expliquent le fait que les études sur les myoblastes primaires sont moins courantes, notamment la difficulté de manipulation de ces myoblastes primaires, la complexité d'obtenir des modèles pertinents, la contrainte liée à l'obtention d'un grand nombre de myoblastes primaires, ainsi que les défis techniques et contraintes associées à leur maintien en culture.

Peu d'études ont été menées à l'échelle des myotubes, et celles que nous avons identifiées proviennent principalement de la lignée cellulaire C2C12. En plus des défis mentionnés précédemment, la formation de myotubes primaires est plus difficile en raison des aléas liés à la fusion et à la différenciation des myoblastes. Il est intéressant de souligner que les études précédentes menées sur les myotubes ont rapporté des valeurs de modules d'élasticité dans des gammes beaucoup plus élevées que celles que nous avons observées dans nos résultats. Ceci peut être dû à plusieurs paramètres dont les conditions de culture, le substrats... etc.

Les valeurs de rigidité des fibres musculaires répertoriées dans la littérature sont légèrement inférieures à celles que nous avons obtenues dans notre étude. Cette variation peut être attribuée à plusieurs facteurs, tels que le type de muscle à partir duquel les fibres sont isolées, les conditions du milieu de culture, le temps écoulé depuis l'isolement des fibres jusqu'à la mesure, ainsi que les différents modèles et âges des échantillons utilisés dans les études précédentes. Il est crucial de standardiser ces paramètres expérimentaux afin de minimiser la variabilité et de faciliter les comparaisons entre les différentes études.

Dans la plupart des études sur les propriétés de rigidité des fibres musculaires, une méthode relativement simple et identique a été utilisée, qui consiste à effectuer des mesures mécaniques sur des sections de muscles. La faible disparité des valeurs de rigidité observée dans ces études par rapport aux études sur les myotubes et les fibres isolées, en plus de l'utilisation de la même méthode, peut également s'expliquer par le fait que la majorité de ces études ont utilisé un modèle animal commun, à savoir des souris C57 ou des souris mdx âgées de 8 à 10 semaines. L'utilisation d'un modèle animal standardisé permet de réduire la variabilité expérimentale et de faciliter la comparaison des résultats entre différentes études.

À l'échelle du muscle, il est observé une disparité notable dans les résultats en fonction de plusieurs facteurs. Les principaux facteurs influençant les résultats comprennent le muscle spécifique qui est mesuré, la position du muscle lors de la mesure, le modèle animal/humain utilisé, son phénotype et son âge. Cependant, les études analysées n'ont pas révélé de différence significative selon le sexe ou les membres mesurés (pattes/pieds droits et gauches). Cela indique que, dans ces études, le sexe ou le choix des membres n'a pas eu d'effet majeur sur les propriétés mécaniques globales du muscle.

Il est intéressant de noter qu'à l'échelle du muscle, une étude temporelle a été réalisée sur des patients atteints de DMD à différents stades de la maladie, ce qui correspond à des âges différents des patients. Les résultats de cette étude sont en accord avec nos propres résultats concernant les changements dans les différences de rigidité entre les individus sains (WT) et les patients atteints de DMD au cours de l'évolution de la maladie.

Globalement, on constate qu'il existe une grande hétérogénéité dans les résultats observés à différentes échelles biologiques, même s'ils proviennent tous du même organe (muscle).

Il est essentiel de souligner que la majorité des études se limitent à une seule échelle biologique et à un seul âge du modèle, ce qui ne permet pas une caractérisation complète de l'avancement et de l'évolution d'une maladie. Comme le démontre notre étude, il est nécessaire de prendre en compte ces paramètres pour une caractérisation adéquate. Nous préconisons donc, dans le cadre d'un modèle donné, d'effectuer des mesures à différentes échelles biologiques et à différents stades de développement afin d'obtenir une représentation complète et cohérente au fil du temps.

En effet, une approche temporelle et multi-échelle présente de nombreux avantages. Tout d'abord, elle permet d'identifier l'échelle biologique du muscle la plus pertinente pour le suivi et le diagnostic de la maladie, celle où on observe les différences les plus marquées entre

individus sains et malades. De plus, une caractérisation temporelle et multi-échelle est essentielle pour évaluer l'efficacité des traitements proposés. En mesurant les changements à différentes échelles et à différents moments après l'administration du traitement, il devient possible d'en évaluer l'efficacité, de déterminer son impact sur la restauration ou la préservation de la fonction musculaire. Cette approche fournit des informations précieuses sur l'efficacité des traitements, ce qui peut guider leur développement et leur optimisation.

Nous pensons que notre étude est exhaustive car elle inclut des aspects temporels et multi-échelles. Néanmoins, il est essentiel de mener des mesures supplémentaires, en particulier sur des rats âgés de 10 mois, et de poursuivre les recherches pour une compréhension précise du lien entre les propriétés mécaniques des différentes échelles et les mécanismes biologiques qui contribuent aux altérations observées dans la DMD.

De plus, nous partageons l'opinion selon laquelle il est essentiel de standardiser les procédures de mesure mécanique à chaque échelle biologique afin de faciliter la comparaison des résultats entre différents laboratoires (Schillers et al., 2017). Cette standardisation permettrait d'établir des protocoles harmonisés pour les études sur les propriétés mécaniques, ce qui faciliterait la collaboration et favoriserait les avancées dans le domaine du diagnostic et du traitement des maladies, y compris la DMD.

## **2. Impact de la DMD sur la fonction migration et prolifération en lien avec la structure du cytosquelette**

Dans notre étude sur l'impact de la DMD sur les propriétés et fonctions biologiques, nous avons principalement focalisé notre attention sur les myoblastes. Les myoblastes sont les cellules fondamentales du muscle et les altérations qui se produisent au niveau de ces cellules peuvent entraîner des répercussions sur les autres échelles du muscle.

Dans notre étude, nous avons principalement utilisé les résultats obtenus à partir des rats âgés d'1 et de 6 mois pour étudier les fonctions de migration, de prolifération et la structure des myoblastes. Dans notre analyse, nous n'avons pas inclus les échantillons provenant de rats âgés de 10 mois en raison d'un nombre limité de répliques disponibles pour ces rats à cet âge.

À l'âge d'1 mois, aucune différence significative n'a été observée entre les myoblastes WT et DMD en termes de vitesse de migration, de temps de persistance, de coefficient de diffusion et de taille moyenne des spots de paxilline. Ce résultat est cohérent avec le phénotype peu prononcé des rats atteints de la DMD à cet âge précoce.



Cependant, à l'âge de 6 mois, nous avons constaté une différence significative entre les myoblastes DMD et WT. Les myoblastes DMD ont montré une vitesse de migration plus élevée et un mouvement plus désordonné par rapport aux myoblastes WT. De plus, les myoblastes DMD ont présenté des spots d'adhérence de paxilline plus grands et plus nombreux par unité de surface.

Une étude réalisée en 2013 a révélé une forte corrélation entre la taille des spots de paxilline et la vitesse de migration des cellules. En normalisant nos résultats concernant la taille des spots de paxilline, nous avons constaté une concordance avec les résultats de la littérature. À l'âge d'1 mois, bien que la différence ne soit pas statistiquement significative, nos résultats ont montré que les myoblastes DMD présentaient des spots de paxilline plus grands. Cette observation est en accord avec l'étude de Kim et ses collaborateurs (D. H. Kim et al., 2013), qui montre une corrélation entre la taille des spots de paxilline et les vitesses de migration élevées. Cette observation se confirme à l'âge de 6 mois, où les myoblastes DMD ont présenté des spots de paxilline encore plus grands, accompagnés d'une différence significative de vitesse de migration par rapport aux myoblastes WT.

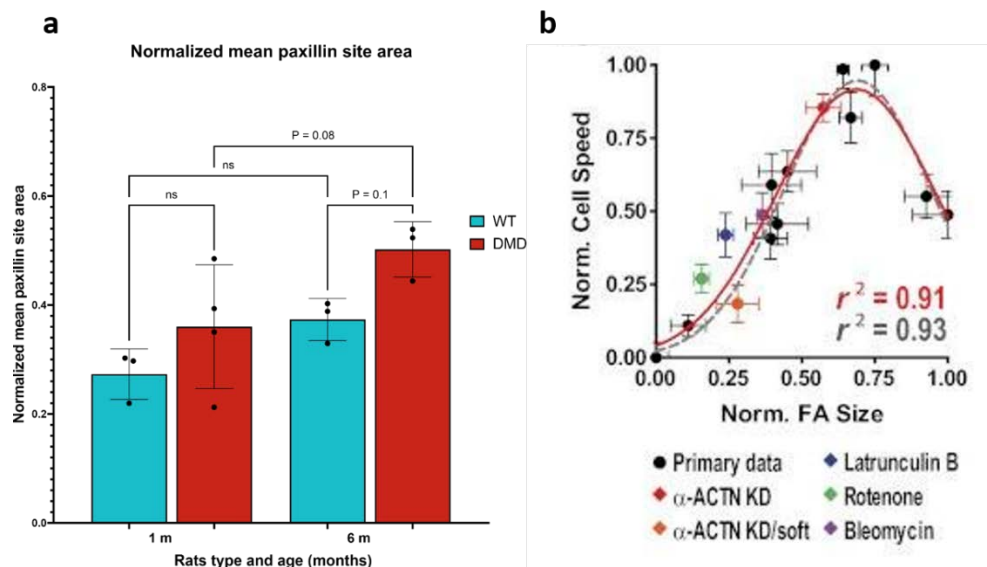


Figure 122 : a. Histogramme montrant les tailles normalisées de spots de paxilline des myoblastes WT et DMD d'1 mois et 6 mois. b. Courbe de comparaison de la relation entre la taille des sites l'adhérence focale et de la vitesse de migration de la cellule (D. H. Kim et al., 2013).

D'un autre côté, nos résultats sont également cohérents avec les études antérieures qui ont montré une relation entre la vitesse de migration et la rigidité cellulaire. En effet, plusieurs études ont suggéré que les cellules qui migrent rapidement ont tendance à être moins rigides. Dans notre étude, nous avons observé que la différence de rigidité entre les myoblastes WT et

DMD n'était pas statistiquement significative à 1 mois. Cependant, cette différence devient significative à 6 mois. Cette observation est en accord avec les résultats de vitesse de migration, qui ont montré une augmentation de la vitesse chez les myoblastes DMD à 6 mois. Ainsi, nos résultats corroborent la relation entre la rigidité et la vitesse de migration pour les myoblastes WT et DMD.

Ce résultat met en évidence l'impact global de la DMD non seulement sur des processus clés tels que la fusion et la différenciation des myoblastes, mais également sur leur capacité migratoire et leurs propriétés mécaniques. Ces deux aspects sont essentiels pour permettre aux myoblastes de se déplacer vers les sites de lésion des fibres musculaires. Ainsi, les altérations observées dans la migration et les propriétés mécaniques des myoblastes DMD peuvent avoir un impact sur la régénération musculaire et contribuer aux déficits fonctionnels associés à la maladie chez le patient.

L'analyse de l'expression des gènes sur des myoblastes WT et DMD de 12 mois a révélé des altérations dans l'expression de gènes impliqués dans le cytosquelette et la fonction de migration cellulaire. Certains gènes étaient sous-exprimés tandis que d'autres étaient surexprimés dans les myoblastes DMD. Cependant, les mécanismes d'action précis de ces protéines, les voies de signalisation sous-jacentes et leur contribution exacte à la migration des myoblastes ne sont pas encore complètement compris. Ainsi, une meilleure compréhension de ces mécanismes, notamment à travers des analyses fonctionnelles en manipulant l'expression de ces gènes pourrait avoir des implications importantes pour le développement de traitements plus ciblés et efficaces pour la DMD.

Nous avons observé, tout comme d'autres recherches l'ont mentionné, que la prolifération des cellules n'est pas affectée par la maladie elle-même, mais plutôt par l'âge des cellules. Cela suggère l'existence de voies de signalisation distinctes régulant la migration et la prolifération.

Pour finir, la DMD entraîne des modifications à la fois au niveau des propriétés biologiques et mécaniques des cellules musculaires. À l'âge de 6 mois chez le modèle de rat, où le phénotype de la maladie est clairement prononcé, toutes ces propriétés sont altérées. Cependant, il est intéressant de noter que ces modifications sont observables de manière plus précoce (à 1 mois) et plus prononcée au niveau des propriétés mécaniques des fibres musculaires. Cela souligne la sensibilité du biomarqueur mécanique et montre l'importance d'évaluer non seulement les caractéristiques biologiques, mais également les propriétés mécaniques pour diagnostiquer et

suivre l'évolution de la dystrophie musculaire de Duchenne mais également pour évaluer l'efficacité des thérapies proposées.

## Conclusions et perspectives

Dans cette étude, nous avons examiné les propriétés mécaniques (élasticité et viscoélasticité) à différentes échelles, du niveau des myoblastes jusqu'au muscle dans son ensemble, ainsi que la structure et les fonctions de migration et de prolifération des myoblastes. Nous avons utilisé deux modèles de rats, le rat WT et un modèle de rat préclinique pertinent de dystrophie musculaire de Duchenne (R-DMDdel52).

Nos investigations ont fait appel à divers dispositifs et méthodes, tels que la microscopie à force atomique (AFM), l'élastographie ultrasonore, l'imagerie confocale pour les échantillons immunomarqués, et la vidéomicroscopie pour le suivi des trajectoires cellulaires.

L'AFM a confirmé qu'il était un outil puissant permettant d'évaluer l'élasticité et la rhéologie à avec une résolution nanométrique. Nous avons réussi à évaluer l'impact de l'angle d'inclinaison entre la surface de l'échantillon et la sonde AFM et proposé une correction à la loi de Hertz pour tenir compte de cet effet. Grâce à l'intégration de la courbure locale des échantillons, nos mesures AFM ont sensiblement amélioré leur précision.

Les myoblastes DMD présentent des altérations inattendues des propriétés mécaniques dès l'âge de 6 mois. De plus, ils se caractérisent par des vitesses de migration plus élevées et des trajectoires moins directes par rapport aux myoblastes WT. L'expression accrue de la paxilline, observée sous la forme de spots plus importants, peut influencer l'adhérence et la migration des myoblastes DMD.

Les myotubes DMD présentent une baisse de la rigidité, particulièrement significative à l'âge de 6 mois, correspondant à une aggravation de la sévérité de la pathologie. La formation des myotubes est une étape critique où des processus essentiels tels que la fusion peuvent être affectés dans la DMD. Des études approfondies prenant en compte ces processus sont nécessaires pour une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents de la DMD et pour compléter les études mécaniques existantes.

Les propriétés mécaniques d'élasticité et de viscoélasticité des fibres musculaires révèlent des différences significatives entre les modèles WT et DMD dès les premiers stades de la maladie. De ce fait, afin de caractériser mécaniquement les myopathies, et notamment la DMD, nous préconisons l'utilisation du modèle de la fibre musculaire pour sa relevance observée à tous les âges y compris à un stade précoce de la maladie.

Le muscle étant une structure multi-échelle, la mesure de la rigidité est influencée par des facteurs tels que l'organisation des fibres de collagène et la présence de fibrose dans la matrice

extracellulaire. Pour une interprétation plus précise, il serait bénéfique d'inclure des études sur l'organisation structurelle du muscle, permettant ainsi une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents et de l'impact de la structure musculaire sur les propriétés mécaniques.

En combinant les résultats à toutes les échelles biologiques, ceux-ci ont montré une augmentation exponentielle de la rigidité du myoblaste à la fibre musculaire, pour les deux modèles et à tous les âges étudiés. Cependant, nous avons également observé que les propriétés mécaniques évoluent de manière distincte entre les différentes échelles cellulaires (myoblastes, myotubes, fibres musculaires) et le muscle dans son ensemble. Nous avons utilisé des ajustements exponentiels pour modéliser l'évolution de la rigidité, et nous avons observé que les ajustements étaient moins précis pour le modèle DMD que pour le modèle WT. De plus, les exposants des lois exponentielles étaient environ deux fois plus faibles pour le modèle DMD par rapport au modèle WT. De ce fait, en plus d'altérer les propriétés mécaniques à chaque échelle, la DMD dégrade également l'évolution de ces propriétés avec une diminution de la rigidité qui s'accroît et à mesure de l'augmentation de l'échelle biologique ce qui est en phase avec les processus biologiques dus à cette maladie.

De ce fait, notre étude semble exhaustive car elle examine les aspects temporels et multi-échelles de la DMD. Cependant, il est nécessaire de poursuivre les recherches pour mieux comprendre le lien précis entre les propriétés mécaniques à différentes échelles et les mécanismes biologiques impliqués dans les altérations observées dans la DMD.

En conclusion, l'utilisation du modèle préclinique de rat R-DMDdel52 avec un phénotype prononcé de la DMD, associée aux mesures mécaniques sensibles telles que celles réalisées avec l'AFM, a permis l'identification de biomarqueurs mécaniques pertinents pour la DMD. Ces progrès constituent un outil sensible et prometteur pour évaluer l'évolution de la maladie et l'efficacité des stratégies thérapeutiques dans le traitement de la DMD et ouvrent ainsi de nouvelles perspectives de recherche dans ce domaine.

# Annexes

# Bibliographie

- AG I. (2005). „The NanoWizard® AFM Handbook 2.2 a.”. In: Berlin.
- Agnetti, G., Herrmann, H., & Cohen, S. J. T. F. J. (2022). New roles for desmin in the maintenance of muscle homeostasis.
- Alberts, B. (2017). *Molecular Biology of the Cell*: W.W. Norton.
- Amoasii, L., Hildyard, Sanchez-Ortiz, E., Mireault, A., Caballero, D., . . . Olson, E. N. (2018). Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Science (New York, N.Y.)*, 362(6410), 86-91. doi:10.1126/science.aau1549
- Angelini, C., & Peterle, E. J. A. m. (2012). Old and new therapeutic developments in steroid treatment in Duchenne muscular dystrophy.
- Ankala, A., Kohn, J. N., Hegde, A., Meka, A., Ephrem, C. L. H., Askree, S. H., . . . Hegde, (2012). Aberrant firing of replication origins potentially explains intragenic nonrecurrent rearrangements within genes, including the human DMD gene.
- Arpan, I., Willcocks, R. J., Forbes, S. C., Finkel, R. S., Lott, D. J., Rooney, W. D., . . . Vandeborne, K. (2014). Examination of effects of corticosteroids on skeletal muscles of boys with DMD using MRI and MRS. *Neurology*, 83(11), 974-980. doi:10.1212/wnl.0000000000000775
- Azevedo, M., & Baylies (2020). Getting into position: nuclear movement in muscle cells.
- Bamburg, J. R., & Bloom, G. S. (2009). Cytoskeletal pathologies of Alzheimer disease. *Cell Motil Cytoskeleton*, 66(8), 635-649. doi:10.1002/cm.20388
- Bang, M.-L., & Chen, 79(10), 2081-2087.
- Banks, G. B., Combs, A. C., Odom, G. L., Bloch, R. J., & Chamberlain, J. S. J. P. g. (2014). Muscle structure influences utrophin expression in mdx mice. *10(6)*, e1004431.
- Behr, T., Fischer, P., Müller-Felber, W., Schmidt-Achert, M., & Pongratz, Myofibrillogenesis in primary tissue cultures of adult human skeletal muscle: expression of desmin, titin, and nebulin.
- Belanto, J. J., Mader, T. L., Eckhoff, M. D., Strandjord, D. M., Banks, G. B., Gardner, M. K., . . . Ervasti, J. M. (2014). Microtubule binding distinguishes dystrophin from utrophin. doi:doi:10.1073/pnas.1323842111
- Bentzinger, C. F., Wang, Y. X., & Rudnicki, Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *4(2)*, a008342.
- Bercoff, J., Tanter, M., & Fink, M. (2004). Supersonic shear imaging: a new technique for soft tissue elasticity mapping. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, 51(4), 396-409. doi:10.1109/TUFFC.2004.1295425
- Bercoff, J., Tanter, M., & Fink, 84(12), 2202-2204.
- Bouillard, K., Nordez, A., & Hug, F. J. P. o. (2011). Estimation of individual muscle force using elastography. *6(12)*, e29261.
- Brandenburg, J. E., Eby, S. F., Song, P., Zhao, H., Brault, . . . rehabilitation. (2014). Ultrasound elastography: the new frontier in direct measurement of muscle stiffness.
- Brandenburg, J. E., Eby, S. F., Song, P., Zhao, H., Landry, B. W., Kingsley-Berg, S., . . . An, K. N. (2015). Feasibility and reliability of quantifying passive muscle stiffness in young children by using shear wave ultrasound elastography. *J Ultrasound Med*, 34(4), 663-670. doi:10.7863/ultra.34.4.663



- Brashear, S. E., Wohlgemuth, R. P., Gonzalez, G., & Smith, L. R. (2021). Passive stiffness of fibrotic skeletal muscle in mdx mice relates to collagen architecture. *J Physiol*, 599(3), 943-962. doi:10.1113/jp280656
- Brashear, S. E., Wohlgemuth, R. P. (2017). doi:10.1113/jp280656
- Buddhe, S., Cripe, L., Friedland-Little, J., Kertesz, N., Eghtesady, P., FINDER, J., . . . McNally (2018). Cardiac management of the patient with Duchenne muscular dystrophy.
- Bufi, N., Durand-Smet, P., & Asnacios, A. (2015). Single-cell mechanics: the parallel plates technique. *Methods Cell Biol*, 125, 187-209. doi:10.1016/bs.mcb.2014.11.002
- Burridge, K. W. (2013). The tension mounts: Stress fibers as force-generating mechanotransducers. *Journal of Cell Biology*, 200(1), 9-19. doi:10.1083/jcb.201210090
- Bushby, K., Finkel, R., Wong, B., Barohn, R., Campbell, C., Comi, G. P., . . . McDonald, C. M. (2014). Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. *Muscle Nerve*, 50(4), 477-487. doi:10.1002/mus.24332
- Bustamante, C. J., Chemla, Y. R., Liu, S., & Wang, M. D. (2021). Optical tweezers in single-molecule biophysics. *Nature Reviews Methods Primers*, 1(1), 25. doi:10.1038/s43586-021-00021-6
- Cadot, B., Gache, V., & Gomes, E. R. (2015). Moving and positioning the nucleus in skeletal muscle doi:10.1080/19491034.2015.1090073
- Nuclear movement during myotube formation is microtubule and dynein dependent and is regulated by Cdc42, Par6 and Par3. *13(8)*, 741-749.
- Canovic, E. P., Qing, B., Mijailovic, A. S., Jagielska, A., Whitfield, M. J., Kelly, E., . . . Van Vliet, Characterizing multiscale mechanical properties of brain tissue using atomic force microscopy, impact indentation, and rheometry. (115), e54201.
- Carlier, M. F., & Pantaloni, D. J. B. (1981). Kinetic analysis of guanosine 5'-triphosphate hydrolysis associated with tubulin polymerization. *20(7)*, 1918-1924.
- Carter, A., Bonyadi, R., & Gifford, M. (2013). The use of fluorescence-activated cell sorting in studying plant development and environmental responses. *The International journal of developmental biology*, 57, 545-552. doi:10.1387/ijdb.130195mg
- Chal, J., & Pourquié, O. J. D. (2017). Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *144(12)*, 2104-2122.
- Chamberlain, J. S., Metzger, J., Reyes, M., Townsend, D., & Faulkner (2007). *Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma.*
- Charrier, E., Montel, L., Asnacios, A., Delort, F., Vicart, P., Gallet, F., . . . Henon, S. (2018). The desmin network is a determinant of the cytoplasmic stiffness of myoblasts. doi:10.1111/boc.201700040
- Chaudhuri, O., Cooper-White, J., Janmey, P. A., Mooney, D. J., & Shenoy, V. B. (2020). Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour. *Nature*, 584(7822), 535-546. doi:10.1038/s41586-020-2612-2
- Chauvière, A., Preziosi, L., & Verdier, C. (2010). *Cell mechanics: from single scale-based models to multiscale modeling*: CRC Press.
- Chernyatina, A. A., Guzenko, D., & StrelkovIntermediate filament structure: the bottom-up approach.
- Clark, K. A. M., Abigail S Beckerle, Mary C Gregorio, Carol C %J Annual review of cell developmental biology. (2002). Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function.
- Clarkson, E., Costa, C. F., & Machesky, L. M. (2004). Congenital myopathies: diseases of the actin cytoskeleton. *J Pathol*, 204(4), 407-417. doi:10.1002/path.1648

- Cohen, E., Bonne, G., Rivier, F., & Hamroun, D. J. N. D. (2021). The 2022 version of the gene table of neuromuscular disorders (nuclear genome).
- Collins, B. C., Shapiro, J. B., Scheib, M. M., Musci, R. V., Verma, M., & Kardon, G. (2023). Cellular Dynamics of Skeletal Muscle Regeneration. 2023.2005.2002.538744. doi:10.1101/2023.05.02.538744 %J bioRxiv
- Collins, C. A., Olsen, I., Zammit, P. S., Heslop, L., Petrie, A., Partridge, T. A., & Morgan, J. E. J. C. (2005). Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *122*(2), 289-301.
- Collinsdictionary. Cytoskeleton.
- Collinsworth, A. M., Zhang, S., Kraus, W. E., & Truskey, G. A. J. A. J. o. P.-C. P. (2002). Apparent elastic modulus and hysteresis of skeletal muscle cells throughout differentiation.
- Cooper, W. G., & Konigsberg Dynamics of myogenesis in vitro.
- Cossu, G., Previtali, S. C., Napolitano, S., Cicalese, M. P., Tedesco, F. S., Nicastro, F., . . . Ciceri, F. (2015). Intra-arterial transplantation of HLA-matched donor mesoangioblasts in Duchenne muscular dystrophy. <https://doi.org/10.15252/emmm.201505636>
- Cossu, G., & Tajbakhsh, S. (2007). Oriented Cell Divisions and Muscle Satellite Cell Heterogeneity. *Cell*, *129*(5), 859-861. doi:10.1016/j.cell.2007.05.029
- Costa, (2014). Cytoskeleton and adhesion in myogenesis.
- Cramer, L. P. (1997). MOLECULAR MECHANISM OF ACTIN-DEPENDENT RETROGRADE FLOW IN LAMELLIPODIA OF MOTILE CELLS. doi:10.2741/a189
- De Zordo, T., Lill, S. R., Fink, C., Feuchtner, G. M., Jäschke, W., Bellmann-Weiler, R., & Klausner (2009). Real-time sonoelastography of lateral epicondylitis: comparison of findings between patients and healthy volunteers.
- Deffieux, T. (2008). Palpation par force de radiation ultrasonore et échographie ultrarapide : Applications à la caractérisation tissulaire in vivo.
- Desai, B. V., Harmon, R. M., & Green *122*(24), 4401-4407.
- Desprat, N. (2005). *Rhéologie à l'échelle d'une cellule vivante*. Université Paris Diderot,
- Di Carlo, D. J. J. o. l. a. (2012). A mechanical biomarker of cell state in medicine.
- Dias, P., Dilling, M., & Houghton, P. (1994). *The molecular basis of skeletal muscle differentiation*. Paper presented at the Seminars in diagnostic pathology.
- Dimario, J., Buffinger, N., Yamada, S., & Strohman, R. J. S. (1989). Fibroblast growth factor in the extracellular matrix of dystrophic (mdx) mouse muscle.
- Drapaca, C., Sivaloganathan, S., Drapaca, C., Sivaloganathan, o. t. (2019). Brief review of continuum mechanics theories.
- Drolle, E., Hane, F., Lee, B., & Leonenko, Z. J. D. m. r. (2014). Atomic force microscopy to study molecular mechanisms of amyloid fibril formation and toxicity in Alzheimer's disease. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.07.011>
- Duan, D., Goemans, N., Takeda, S. i., Mercuri, E., & Aartsma-Rus, Duchenne muscular dystrophy.
- Duchenne, G.-B. (1858). *De l'ataxie locomotrice progressive, recherches sur une maladie caractérisée spécialement par des troubles généraux de la coordination des mouvements*: Impr. Rignoux.
- Dumont, N. A., Bentzinger, C. F., Sincennes, M. C., & Rudnicki, Satellite cells and skeletal muscle regeneration. *5*(3), 1027-1059.
- Dumont, N. A., Wang, Y. X., Von Maltzahn, J., Pasut, A., Bentzinger, C. F., Brun, C. E., & Rudnicki, *21*(12), 1455-1463.

- e Lima, K. M. M., Júnior, J. F. S. C., de Albuquerque Pereira, W. C., & De Oliveira, Assessment of the mechanical properties of the muscle-tendon unit by supersonic shear wave imaging elastography: a review.
- Eaton, P., & West, P. (2010). *Atomic force microscopy*: Oxford university press.
- Eby, S. F., Cloud, B. A., Brandenburg, J. E., Giambini, H., Song, P., Chen, S., . . . 30(1), 22-27.
- (1976). Membrane viscoplastic flow.
- Exeter, D., & Connell, D. A. (2010). *Skeletal muscle: functional anatomy and pathophysiology*. Paper presented at the Seminars in musculoskeletal radiology.
- Falzarano, M. S., Scotton, C., Passarelli, C., & Ferlini, A. J. M. (2015). Duchenne muscular dystrophy: from diagnosis to therapy. 20(10), 18168-18184.
- Fededa, J. P., & Gerlich (2012). Molecular control of animal cell cytokinesis.
- Feher, J. (2012). 3.5 - Contractile Mechanisms in Skeletal Muscle. In J. Feher (Ed.), *Quantitative Human Physiology* (pp. 249-258). Boston: Academic Press.
- Féréol, S., Fodil, R., Laurent, V. M., Balland, M., Louis, B., Pelle, G., . . . Isabey, 96(5).
- Fereol, S., & Fodil, Effect of cholesterol depletion on the viscoelastic properties of alveolar epithelial cells assessed by atomic force microscopy in large deformation.
- Finder, J., Mayer, O. H., Sheehan, D., Sawhani, H., Abresch, R. T., Benditt, J., . . . medicine, c. c. (2017). Pulmonary endpoints in Duchenne muscular dystrophy. A workshop summary.
- Flatres, A., Aarab, Y., Nougaret, S., Garnier, F., Larcher, R., Amalric, M., . . . Jung, B. (2020). Correction to: Real-time shear wave ultrasound elastography: a new tool for the evaluation of diaphragm and limb muscle stiffness in critically ill patients. *Critical care (London, England)*, 24(1), 79-79. doi:10.1186/s13054-020-2802-1
- Fletcher, D. A., & Mullins, R. D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463(7280), 485-492. doi:10.1038/nature08908
- Fletcher, D. A., & Mullins, Cell mechanics and the cytoskeleton. 463(7280), 485-492.
- Fodil, R., Laurent, V., Planus, E., & Isabey, D. (2003). Characterization of cytoskeleton mechanical properties and 3D-actin structure in twisted adherent epithelial cells. *Biorheology*, 40, 241-245.
- Fong, P., Turner, P. R., Denetclaw, W. F., & Steinhardt, Increased activity of calcium leak channels in myotubes of Duchenne human and mdx mouse origin. 250(4981), 673-676.
- Frontera, W. R., & Ochala, J. (2015). Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcified Tissue International*, 96(3), 183-195. doi:10.1007/s00223-014-9915-y
- Fu, Y., Ferdos, F., Sadeghi, M., Wang, S., & Larsson (2002). Photoluminescence of an assembly of size-distributed self-assembled InAs quantum dots.
- Fujita, N., Fujimoto, T., Tasaki, H., Arakawa, T., Matsubara, T., & Miki, A. (2009). Influence of muscle length on muscle atrophy in the mouse tibialis anterior and soleus muscles. *Biomed Res*, 30(1), 39-45. doi:10.2220/biomedres.30.39
- Fung, Y.-c. (2013). *Biomechanics: mechanical properties of living tissues*: Springer Science & Business Media.
- Galbraith, C., Skalak, R., Chien, 40(4), 317-330.
- Gautel, M., & Djinić-CarugoThe sarcomeric cytoskeleton: from molecules to motion.
- Gieron-Korthals, M., & Fernandez, R. (2020). New Developments in Diagnosis, Treatment, and Management of Duchenne Muscular Dystrophy. *Advances in Pediatrics*, 67, 183-196. doi:<https://doi.org/10.1016/j.yapd.2020.03.002>
- Girardi, F., Taleb, A., Ebrahimi, M., Datye, A., Gamage, D. G., Peccate, C., . . . Le Grand, F. (2021). TGF $\beta$  signaling curbs cell fusion and muscle regeneration. *Nat Commun*, 12(1), 750. doi:10.1038/s41467-020-20289-8

- Gittes, F., Mickey, B., Nettleton, J., & Howard (1993). Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J Cell Biol*, 120(4), 923-934. doi:10.1083/jcb.120.4.923
- Gokhin, D. S., Ochala, J., Domenighetti, & Fowler, Tropomodulin 1 directly controls thin filament length in both wild-type and tropomodulin 4-deficient skeletal muscle. *142(24)*, 4351-4362.
- Gomez, T. M., & Letourneau, *129(2)*, 221-234.
- Goodson, H. V., & Jonasson (2018). Microtubules and microtubule-associated proteins.
- Guan, X., Liu, X., Jia, X., Yuan, Y., Cui, J., & Mang, H. A. (2015). A stochastic multiscale model for predicting mechanical properties of fiber reinforced concrete. *International Journal of Solids and Structures*, 56-57, 280-289. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijsolstr.2014.10.008>
- Guck, J., Ananthakrishnan, R., Mahmood, H., Moon, T. J., Cunningham, C. C., & Käs, J. (2001). The Optical Stretcher: A Novel Laser Tool to Micromanipulate Cells. *Biophysical journal*, 81(2), 767-784. doi:[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75740-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75740-2)
- Guevorkian, K., & Maître, J. L. (2017). Chapter 10 - Micropipette aspiration: A unique tool for exploring cell and tissue mechanics in vivo. In T. Lecuit (Ed.), *Methods Cell Biol* (Vol. 139, pp. 187-201): Academic Press.
- Guimarães Carlos F, G. L., Marques Alexandra, P Reis, Rui L %J Nature Reviews Materials. (2020). The stiffness of living tissues and its implications for tissue engineering.
- Guiraud, S., Roblin, D., & Kay, The potential of utrophin modulators for the treatment of Duchenne muscular dystrophy.
- Gunning, P. W., Ghoshdastider, U., Whitaker, S., Popp, D., & Robinson, R. C. (2015). The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. *J Cell Sci*, 128(11), 2009-2019. doi:10.1242/jcs.165563
- Hakibilen, C., Delort, F., Daher, M.-T., Joanne, P., Cabet, E., Cardoso, O., . . . 10. (1989). Nuclear domains in muscle cells. *59(5)*, 771-772.
- Hansma, P. K., Elings, V., Marti, O., & Bracker, C. J. S. (1988). Scanning tunneling microscopy and atomic force microscopy: application to biology and technology. *242(4876)*, 209-216.
- Hao, Y., Cheng, S., Tanaka, Y., Hosokawa, Y., Yalikun, Y., & Li, M. (2020). Mechanical properties of single cells: Measurement methods and applications. *Biotechnology Advances*, 45, 107648. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107648>
- Hardin, J., Bertoni, G., & Kleinsmith, L. (2022). *Becker's World of the Cell, Global Edition*: Pearson Education Limited.
- Hawkins, T., Mirigian, M., Selcuk Yasar, M., & Ross, J. L. (2010). Mechanics of microtubules. *J Biomech*, 43(1), 23-30. doi:10.1016/j.jbiomech.2009.09.005
- Henderson, C. A., Gomez, C. G., Novak, *7(3)*, 891.
- Hernández, J. M., & Podbilewicz (2017). The hallmarks of cell-cell fusion. *144(24)*, 4481-4495.
- Heydemann, A., & Siemionow, M. (2023). A Brief Review of Duchenne Muscular Dystrophy Treatment Options, with an Emphasis on Two Novel Strategies.
- Hindi, S. M., Tajrishi, M. M., & Kumar (2013). Signaling mechanisms in mammalian myoblast fusion.
- Hodne, K., & Weltzien, F.-A. (2015). Single-Cell Isolation and Gene Analysis: Pitfalls and Possibilities. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 26832-26849. doi:10.3390/ijms161125996
- Hogrel, J. Y., Decostre, V., Ledoux, I., de Antonio, M., Niks, E. H., de Groot, I., . . . Servais, L. (2020). Normalized grip strength is a sensitive outcome measure through all stages

- of Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol*, 267(7), 2022-2028. doi:10.1007/s00415-020-09800-9
- Hohmann, T., & Dehghani, 8(4), 362.
- Howard, J. (2001). *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*: Sinauer Associates, Publishers.
- Huard, J., Labrecque, C., Dansereau, G., Robitaille, L., Tremblay, 14(2), 178-182.
- Hummel, R. (2005). *Understanding Materials Science: History · Properties · Applications*.
- Hutter, J. L., & Bechhoefer, Calibration of atomic-force microscope tips. 64(7), 1868-1873.
- Ikai, A. (2016). *The World of Nano-Biomechanics*: Elsevier Science.
- Jaisser, F., & Farman, 68(1), 49-75.
- Janssen, B., Hartmann, C., Scholz, V., Jauch, A., & Zschocke (2005). MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene: potential and pitfalls.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), 816-821. doi:10.1126/science.1225829
- Karolczak, J., Pavlyk, I., Majewski, Ł., Sobczak, M., Niewiadomski, P., Rzhetsky, Y., . . . Biology, C. (2015). Involvement of unconventional myosin VI in myoblast function and myotube formation.
- Keating, C., & Cullen (2021). Mechanosensation in traumatic brain injury. *Neurobiology of Disease*, 148, 105210. doi:10.1016/j.nbd.2020.105210
- Keeling, M. C., Flores, L. R., Dodhy, A. 7(1), 5219.
- Kemaladewi, Hoen, Dijke, P. t., Ommen, G. J. v., & Hoogaars, W. M. (2012). TGF-β signaling in Duchenne muscular dystrophy. doi:10.2217/fnl.12.3
- Kieny, P., Chollet, S., Delalande, P., Le Fort, M., Magot, A., Pereon, Y., . . . medicine, r. (2013). Evolution of life expectancy of patients with Duchenne muscular dystrophy at AFM Yolaine de Kepper centre between 1981 and 2011.
- Kim, D. H., & Wirtz, D. (2013). Focal adhesion size uniquely predicts cell migration. *Faseb j*, 27(4), 1351-1361. doi:10.1096/fj.12-220160
- Kim, J. H., Jin, P., Duan, R., & Chen, E. H. (2015). Mechanisms of myoblast fusion during muscle development. *Curr Opin Genet Dev*, 32, 162-170. doi:10.1016/j.gde.2015.03.006
- Klymiuk, N., Blutke, A., Graf, A., Krause, S., Burkhardt, K., Wuensch, A., . . . Wolf, E. (2013). Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. *Human Molecular Genetics*, 22(21), 4368-4382. doi:10.1093/hmg/ddt287 %J Human Molecular Genetics
- Knöbel, M., O'Toole, E. A., & Smith, F. J. (2015). Keratins and skin disease. *Cell Tissue Res*, 360(3), 583-589. doi:10.1007/s00441-014-2105-4
- Kodera, N., & Ando, High-speed atomic force microscopy to study myosin motility.
- Kodera, N., Yamamoto, D., Ishikawa, R., & Ando, T. J. N. (2010). Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. 468(7320), 72-76.
- Koenig, M., Hoffman, E., Bertelson, C., Monaco, A., Feener, C., & Kunkel, Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. 50(3), 509-517.
- Kojima, H. I., Akihiko; Yanagida, Toshio %J Proceedings of the National Academy of Sciences. (1994). Direct measurement of stiffness of single actin filaments with and without tropomyosin by in vitro nanomanipulation.
- Kreis, T. E., & Birchmeier, Stress fiber sarcomeres of fibroblasts are contractile. 22(2), 555-561.

- Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F., & Rudnicki, Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *129*(5), 999-1010.
- Lacourpaille, L., Gross, R., Hug, F., Guével, A., Péréon, Y., Magot, A., . . . Nordez, Supersonic shear imaging provides a reliable measurement of resting muscle shear elastic modulus.
- Lai, L., Xu, X., Lim, C. T., & Cao, J. (2015). Stiffening of Red Blood Cells Induced by Cytoskeleton Disorders: A Joint Theory-Experiment Study. *Biophysical journal*, *109*(11), 2287-2294. doi:10.1016/j.bpj.2015.10.036
- Lamolle, S. F., Monjo, M., Lyngstadaas, S. P., Ellingsen, J. 88(3), 581-588.
- Ledbetter, M., & Porter, A "microtubule" in plant cell fine structure.
- Lekka, M., Pogoda, K., Gostek, J., Klymenko, O., Prauzner-Bechcicki, S., Wiltowska-Zuber, J., . . . Stachura, Z. (2012). Cancer cell recognition--mechanical phenotype. *Micron*, *43*(12), 1259-1266. doi:10.1016/j.micron.2012.01.019
- Lekka, M., Zwieten, R. W. v., Kuntzer, T., & Mermod, N. (2014). Assessing dystrophies and other muscle diseases at the nanometer scale by atomic force microscopy.
- Lerario, A., Bonfiglio, S., Sormani, M., Tettamanti, A., Markt, S., Napolitano, S., . . . Mercuri, E. J. B. n. (2012). Quantitative muscle strength assessment in duchenne muscular dystrophy: longitudinal study and correlation with functional measures.
- Leube, R. E., Moch, M., & Windoffer, R. (2017). Intracellular Motility of Intermediate Filaments. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *9*(6). doi:10.1101/cshperspect.a021980
- Lewis, C., & Ohlendieck, K. (2010). Proteomic profiling of naturally protected extraocular muscles from the dystrophin-deficient mdx mouse. *Biochem Biophys Res Commun*, *396*(4), 1024-1029. doi:10.1016/j.bbrc.2010.05.052
- Li, B., Lin, M., Tang, Y., Wang, B., & Wang, J. H. (2008). A novel functional assessment of the differentiation of micropatterned muscle cells. *J Biomech*, *41*(16), 3349-3353. doi:10.1016/j.jbiomech.2008.09.025
- Li, C., & Samulski, R. J. (2020). Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*, *21*(4), 255-272. doi:10.1038/s41576-019-0205-4
- Li, Z., Mericskay, M., Agbulut, O., Butler-Browne, G., Carlsson, L., Thornell, L.-E., . . . Paulin, D. (1997). Desmin Is Essential for the Tensile Strength and Integrity of Myofibrils but Not for Myogenic Commitment, Differentiation, and Fusion of Skeletal Muscle. *Journal of Cell Biology*, *139*(1), 129-144. doi:10.1083/jcb.139.1.129 %J Journal of Cell Biology  
<https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2021.06.008>
- (1986). Assembly of different isoforms of actin and tropomyosin into the skeletal tropomyosin-enriched microfilaments during differentiation of muscle cells in vitro.
- Liu, D., Black, B. L., & Derynck, R. (2001). TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev*, *15*(22), 2950-2966. doi:10.1101/gad.925901
- Liu, F., Liang, Z., Xu, J., Li, W., Zhao, D., Zhao, Y., & Yan, C. (2016). Activation of the wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway in Polymyositis, Dermatomyositis and Duchenne Muscular Dystrophy. *J Clin Neurol*, *12*(3), 351-360. doi:10.3988/jcn.2016.12.3.351
- Gardiner, P. F., & McComas, A. J. (2006). *Skeletal Muscle: Form and Function: Human Kinetics*.
- Magri, F., Govoni, A., D'Angelo, 258, 1610-1623.
- Marae-Djouda, J. (2016). *Caractérisation optique des déformations à l'échelle nanométrique*.
- Martens, J. C., & Radmacher 456, 95-100.
- Maruyama, K., & Ebashi (1965).  $\alpha$ -Actinin, a new structural protein from striated muscle II. Action on actin.



- Matsuyoshi, Y., Akahoshi, M., Nakamura, M., Tatsumi, R., & Mizunoya, W. (2019). Isolation and purification of satellite cells from young rats by percoll density gradient centrifugation. In *Myogenesis* (pp. 81-93): Springer.
- Mattila, P. K., & Lappalainen 9(6), 446-454.
- Mcdonald, C. M., Henricson, Abresch, M., Eagle, M., Gappmaier, E., . . . nerve. (2013). The 6-minute walk test and other endpoints in Duchenne muscular dystrophy: longitudinal natural history observations over 48 weeks from a multicenter study. *48*(3), 343-356.
- Melendez, J., Sieiro, D., Salgado, D., Morin, V., Dejardin, M.-J., Zhou, C., . . . Marcelle, C. J. N. C. (2021). TGF $\beta$  signalling acts as a molecular brake of myoblast fusion.
- Meltzer, S., Resch, R., Koel, B. E., Thompson, M. E., Madhukar, A., Requicha, J. L. (2001). Fabrication of nanostructures by hydroxylamine seeding of gold nanoparticle templates. *17*(5), 1713-1718.
- Mendell, J. R., Shilling, C., Leslie, N. D., Flanigan, K. M., al-Dahhak, R., Gastier-Foster, J., . . . Aoyagi, *71*(3), 304-313.
- Mercuri, E., Bönnemann, C. G., & Muntoni, *394*(10213), 2025-2038.
- Mescher, A. (2013). *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, Thirteenth Edition: Text and Atlas, Thirteenth Edition*: McGraw-Hill Education.
- Messina, S., & Vita, G. L. (2018). Clinical management of Duchenne muscular dystrophy: the state of the art. *Neurol Sci*, *39*(11), 1837-1845. doi:10.1007/s10072-018-3555-3
- Meyer, P., Notarnicola, C., Meli, A. C., Matecki, S., Hugon, G., Salvador, J., . . . Carnac, G. (2021). Skeletal Ryanodine Receptors Are Involved in Impaired Myogenic Differentiation in Duchenne Muscular Dystrophy Patients.
- O'Rourke, J. R., Sutherland, L. B., Bezprozvannaya, S., Shelton, J. M., Bassel-Duby, R., & Olson (2013). Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *499*(7458), 301-305.
- Miranda, A. F., Bonilla, E., Martucci, G., Moraes, C., Hays, A., & Dimauro, *132*(3), 410.
- Mitchison, T., & Kirschner, M. J. n. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *312*(5991), 237-242.
- Mitsui, K., Hara, M., & Ikai, Mechanical unfolding of  $\alpha$ 2-macroglobulin molecules with atomic force microscope. *385*(1-2), 29-33.
- Moebs, W., Ling, S. J., & Sanny, J. (2016). *University Physics Volume 1*: Rice University.
- , B., & ENGEL, Duchenne dystrophy: *Electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber* *51*(1), 1-1-a. doi:10.1212/WNL.51.1.1-a %J Neurology
- Mooren, O. L., Galletta, B. J., & Cooper, *81*, 661-686.
- Moreno-Flores, S., Benitez, R., dM Vivanco, M., & Toca-Herrera, Stress relaxation and creep on living cells with the atomic force microscope: a means to calculate elastic moduli and viscosities of cell components.
- Morrison, B. M. (2016). *Neuromuscular diseases*. Paper presented at the Seminars in neurology.
- Morrow, J. S., Rimm, D. L., Kennedy, S. P., Cianci, C. D., Sinard, J. H., & Weed, S. A. Of Membrane Stability and Mosaics: The Spectrin Cytoskeleton. In *Comprehensive Physiology* (pp. 485-540).
- Mostowy, S., & Cossart, P. (2012). Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *13*(3), 183-194. doi:10.1038/nrm3284
- Mücke, N., Wedig, T., Bürer, A., Marekov, L. N., Steinert, P. M., Langowski, J., . . . Herrmann, *340*(1), 97-114.
- Mukund, K., & Subramaniam, S. (2020). Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. doi:10.1002/wsbm.1462

- Müller, D. J., Janovjak, H., Lehto, T., Kuerschner, L., Anderson, (2002). Observing structure, function and assembly of single proteins by AFM.
- Musa, H., Orton, C., Morrison, E. E., & Peckham, M. (2003). Microtubule assembly in cultured myoblasts and myotubes following nocodazole induced microtubule depolymerisation. *J Muscle Res Cell Motil*, 24(4-6), 301-308.
- Nagy, K. L., & Blum, A. E. (1994). Scanning probe microscopy of clay minerals. *Nakai*, 170(1), 85-106.
- Nesmith, Wagner, M. A., Pasqualini, O'Connor, B. B., Pincus, M. J., August, P. R., & Parker, A human in vitro model of Duchenne muscular dystrophy muscle formation and contractility. *The Journal of cell biology*, 215(1), 47-56. doi:10.1083/jcb.201603111
- Nguyen, N.-U.-N., Liu, T.-Y., & Wang, H.-V. (2016). Timing appearance and integration of actin-organizing palladin protein in dynamic myofibril assembly. doi:10.1101/047183 %J bioRxiv
- Nishikawa, K. (2020). Titin: A Tunable Spring in Active Muscle. 35(3), 209-217. doi:10.1152/physiol.00036.2019
- Oddoux, S., Zaal, K. J., Tate, V., Kenea, A., Nandkeolyar, . . . Ralston, E. (2013). Microtubules that form the stationary lattice of muscle fibers are dynamic and nucleated at Golgi elements. *Journal of Cell Biology*, 203(2), 205-213. doi:10.1083/jcb.201304063 %J Journal of Cell Biology
- Ohi, R., & Zanic, M. J. F. (2016). Ahead of the curve: new insights into microtubule dynamics.
- Olguin, H. C., Yang, Z., Tapscott, S. J., & Olwin, Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination.
- Ong, M. S., Deng, S., Halim, C. E., Cai, W., Tan, T. Z., Huang, R. Y., . . . Yap, C. T. (2020). Cytoskeletal Proteins in Cancer and Intracellular Stress: A Therapeutic Perspective. *Cancers (Basel)*, 12(1). doi:10.3390/cancers12010238
- Ophir, J., Cespedes, I., Ponnekanti, H., Yazdi, Y., & Li, X. (1991). Elastography: a quantitative method for imaging the elasticity of biological tissues.
- Ornstein, L. (1919). *On the Brownian motion*. Paper presented at the Proc. Amst.
- Orr, A. W. H., Brian P Blackman, Brett R Schwartz, Martin A %J Developmental cell. (2006). Mechanisms of mechanotransduction. <https://doi.org/10.1002/path.1639>
- Pellegrini, L., Wetzels, A., Grannó, S., Heaton, G., & Harvey, K. (2017). Back to the tubule: microtubule dynamics in Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci*, 74(3), 409-434. doi:10.1007/s00018-016-2351-6
- Cheng, H., Ross, R. S., Knowlton, K. U., & Chen, J. (2011). The costamere bridges sarcomeres to the sarcolemma in striated muscle. *Prog Pediatr Cardiol*, 31(2), 83-88. doi:10.1016/j.ppedcard.2011.02.003
- Petry, S. (2016). Mechanisms of Mitotic Spindle Assembly. *Rev Biochem*, 85, 659-683. doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014528
- (1961). Differentiation in regeneration I. The development of muscle and cartilage following deplantation of regenerating limb blastemata of *Amblystoma* larvae.
- Pinotsis, N., Abrusci, P., Djinović-Carugo, K., & Wilmanns, M. (2023). Terminal assembly of sarcomeric filaments by intermolecular beta-sheet formation. *Trends Biochem. Sci.* 34(2009),33-39.
- Pollard. (2016). Actin and actin-binding proteins.
- Pollard, T. D., & Cooper, J. A. J. s. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. 326(5957), 1208-1212.
- Pollard, T. D., & Goldman, 10(7), a030288.
- Porat-Shliom, N., Milberg, O., Masedunskas, A., Weigert, R. J. C., & Sciences, M. L. (2013). Multiple roles for the actin cytoskeleton during regulated exocytosis.



- Pottecher, J. (2012). *Skeletal muscle and experimental ischemia-reperfusion members : mechanisms involved in the protective effects of cyclosporine and the limiting factors of pharmacologic and ischemic postconditioning*  
*Muscle squelettique et ischémie-reperfusion expérimentale des membres : mécanismes impliqués dans la protection ou les effets délétères de la cyclosporine et facteurs limitant les conditionnements pharmacologique et ischémique.*
- Prasad, V., & Millay, D. P. (2021). Skeletal muscle fibers count on nuclear numbers for growth. *Semin Cell Dev Biol*, 119, 3-10. doi:10.1016/j.semcdb.2021.04.015
- Prill, K., & Dawson (2020). Assembly and maintenance of sarcomere thin filaments and associated diseases.
- Prins, K. W., Humston, J. L., Mehta, A., Tate, V., Ralston, E., & Ervasti, J. M. (2009). Dystrophin is a microtubule-associated protein. *Journal of Cell Biology*, 186(3), 363-369. doi:10.1083/jcb.200905048 %J Journal of Cell Biology
- Pritchard, R. & Terentjev (2014). Mechanics of biological networks: from the cell cytoskeleton to connective tissue. *10(12)*, 1864-1884.
- Puig-De-Morales, M., Grabulosa, M., Alcaraz, J., Mullol, J., Maksym, G. N., Fredberg, J. J., & Navajas, D. (2001). Measurement of cell microrheology by magnetic twisting cytometry with frequency domain demodulation. *J Appl Physiol (1985)*, 91(3), 1152-1159. doi:10.1152/jappl.2001.91.3.1152
- Puttini, S., Lekka, M., Dorchies, O. M., Saugy, D., Incitti, T., Ruegg, U. T., . . . Mermod, N. (2009). Gene-mediated restoration of normal myofiber elasticity in dystrophic muscles. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 17(1), 19-25. doi:10.1038/mt.2008.239
- Radmacher, M., Tillmann, R., Fritz, M., & Gaub, (1992). From molecules to cells: imaging soft samples with the atomic force microscope.
- & Ireland. (2004). The cytoskeleton and disease.
- Relaix, F., Bencze, M., Borok, M. J., Der Vartanian, A., Gattazzo, F., Mademtoglou, D., . . . Taglietti. (2021). Perspectives on skeletal muscle stem cells. *Nat Commun*, 12(1), 692. doi:10.1038/s41467-020-20760-6
- Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-Morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S., . . . Buckingham, M. (2006). Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *The Journal of cell biology*, 172, 91-102. doi:10.1083/jcb.200508044
- Ricotti, V., Mandy, W. P., Scoto, M., Pane, M., Deconinck, N., Messina, S., . . . Neurology, C. (2016). Neurodevelopmental, emotional, and behavioural problems in Duchenne muscular dystrophy in relation to underlying dystrophin gene mutations.
- Rigato, A. (2015). *Characterization of cell mechanics with atomic force microscopy: Mechanical mapping and high-speed microrheology*. Aix-Marseille,
- Robert, A., Hookway, C., & Gelfand 38(3), 232-243.
- Rodgers, King, K. Cromie, M. J., Charville, G. W., Maguire, . . . Rando, T. A. (2014). mTORC1 controls the adaptive transition of quiescent stem cells from G0 to G(Alert). *Nature*, 510(7505), 393-396. doi:10.1038/nature13255
- Rosenberg, A. S., Puig, M., Nagaraju, K., Hoffman, E. P., Villalta, . . . Woodcock, J. (2015). Immune-mediated pathology in Duchenne muscular dystrophy. *Sci Transl Med*, 7(299), 299rv294. doi:10.1126/scitranslmed.aaa7322
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2016). *Histology: A Text and Atlas : with Correlated Cell and Molecular Biology*: Wolters Kluwer Health.
- Rudnicki, M., Le Grand, F., McKinnell, I., & Kuang, S. (2008). *The molecular regulation of muscle stem cell function*. Paper presented at the Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology.

- Rybakova, Patel, J. R., & Ervasti, J. M. (2000). The Dystrophin Complex Forms a Mechanically Strong Link between the Sarcolemma and Costameric Actin. *Journal of Cell Biology*, 150(5), 1209-1214. doi:10.1083/jcb.150.5.1209 %J Journal of Cell Biology
- Ryder, S., Leadley, R., Armstrong, N., Westwood, M., De Kock, S., Butt, T., . . . Kleijnen, (2017). Intermediate filaments at the junction of mechanotransduction, migration, and development.
- Sarvazyan, A., Hall, T. J., Urban, M. W., Fatemi, M., Aglyamov, S. R., & Garra, B. S. (2011). *Curr Med Imaging Rev*, 7(4), 255-282. doi:10.2174/157340511798038684
- Schillers, H., Rianna, C., Schäpe, J., Luque, T., Doschke, H., Wälte, M., . . . Radmacher, M. (2017). Standardized Nanomechanical Atomic Force Microscopy Procedure (SNAP) for Measuring Soft and Biological Samples. *Scientific Reports*, 7(1), 5117. doi:10.1038/s41598-017-05383-0
- Schowalter, W. R. (1978). *Mechanics of non-Newtonian fluids*: Pergamon.
- Schultz, E., Jaryszak, D. 8(3), 217-222.
- Sela, B. A. (2002). [Titin: some aspects of the largest protein in the body]. *Harefuah*, 141(7), 631-635, 665.
- Selsby, J. T., Ross, J. W., Nonneman, D., & Hollinger 56(1), 116-126.
- Sen, S., & Kumar, S. (2009). Cell-Matrix De-Adhesion Dynamics Reflect Contractile Mechanics. *Cell Mol Bioeng*, 2(2), 218-230. doi:10.1007/s12195-009-0057-7
- Sen, S., Tewari, M., Zajac, A., Barton, E., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2011). Upregulation of paxillin and focal adhesion signaling follows Dystroglycan Complex deletions and promotes a hypertensive state of differentiation. *Eur J Cell Biol*, 90(2-3), 249-260. doi:10.1016/j.ejcb.2010.06.005
- Sengupta, K., Mishra, Pyle, & Khurana, Genome Editing-Mediated Utrophin Upregulation in Duchenne Muscular Dystrophy Stem Cells. *Mol Ther Nucleic Acids*, 22, 500-509. doi:10.1016/j.omtn.2020.08.031
- Sengupta, P. (2013). The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med*, 4(6), 624-630.
- Sept, D., Xu, J., Pollard, T. D., & McCammon, 77(6), 2911-2919.
- Snijders, T., Aussieker, T., Holwerda, A., Parise, G., van Loon, & Verdijk (2020). The concept of skeletal muscle memory: Evidence from animal and human studies. *Acta Physiol (Oxf)*, 229(3), e13465. doi:10.1111/apha.13465
- Sokolova, A. V., Kreplak, L., Wedig, T., Mücke, N., Svergun, D. I., Herrmann, H., . . . Strelkov (2006). Monitoring intermediate filament assembly by small-angle x-ray scattering reveals the molecular architecture of assembly intermediates.
- Song, E., Huang, Y., Huang, N., Mei, Y., Yu, X., & Rogers, J. A. (2022). Recent advances in microsystem approaches for mechanical characterization of soft biological tissues. *Microsyst Nanoeng*, 8, 77. doi:10.1038/s41378-022-00412-z
- Sorkin, R., Bergamaschi, G., Kamsma, D., Brand, G., Dekel, E., Ofir-Birin, Y., . . . Wuite, G. J. L. (2018). Probing cellular mechanics with acoustic force spectroscopy. *Mol Biol Cell*, 29(16), 2005-2011. doi:10.1091/mbc.E18-03-0154
- Sparrow, 10(4), 293-298.
- Spence, Chen, Y. J., & Winder (2002). Muscular dystrophies, the cytoskeleton and cell adhesion. 24(6), 542-552.
- Stedman, Sweeney, Shrager, J. B., Maguire, H. C., Panettieri, R. A., Petrof, B., . . . Kelly, A. M. (1991). The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature*, 352(6335), 536-539. doi:10.1038/352536a0
- Steele, A., Goddard, D., Beech, I., Tapper, R., Stapleton, D., & Smith, 189(1), 2-7.
- Stockdale, F. E., & Holtzer, DNA synthesis and myogenesis.

- Streppa, L. (2017). *Characterizing mechanical properties of living C2C12 myoblasts with single cell indentation experiments : application to Duchenne muscular dystrophy* *Caractérisation expérimentale par indentation des propriétés mécaniques de myoblastes : application à la dystrophie musculaire de Duchenne*. Université de Lyon, Retrieved from <https://theses.hal.science/tel-01515389> Ens-lyon
- Stuart, B. H. (2007). *Analytical techniques in materials conservation*: John Wiley & Sons.
- Sumien, N., Shetty, R. A., Gonzales, 145-168.
- Sweeney, H. L., & Holzbaur (2018). Motor Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10(5). doi:10.1101/cshperspect.a021931
- Szeverenyi, I., Cassidy, A. J., Chung, C. W., Lee, B. T., Common, J. E., Ogg, S. C., . . . 29(3), 351-360.
- Taglietti, V., Kefi, K., Bronisz-Budzyńska, I., Mirciloglu, B., Rodrigues, M., Cardone, N., . . . Goddard (2022). Duchenne muscular dystrophy trajectory in R-DMDdel52 preclinical rat model identifies COMP as biomarker of fibrosis.
- Taglietti, V., Kefi, K., Rivera, L., Bergiers, O., Cardone, N., Couplier, F., . . . Relaix, F. (2023). Thyroid-stimulating hormone receptor signaling restores skeletal muscle stem cell regeneration in rats with muscular dystrophy.
- (2009). Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis.
- Tang, A., Cloutier, G., Szeverenyi, N. M., & Sirlin, C. B. (2015). Ultrasound Elastography and MR Elastography for Assessing Liver Fibrosis: Part 1, Principles and Techniques. *AJR Am J Roentgenol*, 205(1), 22-32. doi:10.2214/ajr.15.14552
- Titus (2018). Myosin-driven intracellular transport.
- Tojkander, S., Gateva, G., & Lappalainen, P. (2012). Actin stress fibers – assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci*, 125(8), 1855-1864. doi:10.1242/jcs.098087 %J Journal of Cell Science
- Trimarchi, F., Favalaro, A., Fulle, S., Magaouda, L., Puglielli, C., & Di Mauro, 183(2), 87-98.
- Trovato, F. M., Imbesi, R., Conway, N., & Castrogiovanni, P. (2016). Morphological and Functional Aspects of Human Skeletal Muscle.
- Tsuchiya, Y., Kitajima, Y., Masumoto, H., & Ono, Y. (2020). Damaged Myofiber-Derived Metabolic Enzymes Act as Activators of Muscle Satellite Cells. *Stem Cell Reports*, 15(4), 926-940. doi:<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.08.002>
- (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. 112(4), 467-480.
- Vanapalli, S. A., Duits, M. H., & Mugele, F. (2009). Microfluidics as a functional tool for cell mechanics. *Biomicrofluidics*, 3(1), 12006. doi:10.1063/1.3067820
- Vanlandingham, M., McKnight, S., Palmese, G., Elings, J., Huang, X., Bogetti, T., . . . Gillespie Jr, 64(1-4), 31-59.
- Veltman, D. M., & Insall (2010). WASP family proteins: their evolution and its physiological implications. *Mol Biol Cell*, 21(16), 2880-2893. doi:10.1091/mbc.E10-04-0372
- von Maltzahn, J., Chang, N. C., Bentzinger, C. F., & Rudnicki (2012). Wnt signaling in myogenesis. *Trends Cell Biol*, 22(11), 602-609. doi:10.1016/j.tcb.2012.07.008
- Wagner, K. R., Guglieri, M., Ramaiah, S. K., Charnas, L., Marraffino, S., Binks, M., . . . Muntoni 15(15), 1389-1396.
- Wakatsuki, T., Schwab, B., Thompson, N. C., & Elson (2001). Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells.
- Wang, K., McCarter, R., Wright, J., Beverly, J., & Ramirez-Mitchell, R. (1991). Regulation of skeletal muscle stiffness and elasticity by titin isoforms: a test of the segmental extension model of resting tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(16), 7101-7105. doi:10.1073/pnas.88.16.7101
- Wang, N. (1998). Mechanical Interactions Among Cytoskeletal Filaments. 32(1), 162-165. doi:doi:10.1161/01.HYP.32.1.162

- Wang, N. (2017). Review of cellular mechanotransduction. *50*(23), 233002.
- Wang, Y. I. (1985). Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling. *The Journal of cell biology*, *101*(2), 597-602.
- Warren, *63*(2), 550-566.
- Watt, D. J., Karasinski, J., Moss, J., & England, M. A. (1994). Migration of muscle cells. *Nature*, *368*(6470), 406-407. doi:10.1038/368406a0
- Weiss, (1962). The molecular control of cellular activity.
- Wells, P. N. T., & Liang, H.-D. (2011). Medical ultrasound: imaging of soft tissue strain and elasticity. *Journal of the Royal Society, Interface*, *8*(64), 1521-1549. doi:10.1098/rsif.2011.0054
- Wilkes, G. L. (2003). Polymers, Mechanical Behavior. In R. A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Physical Science and Technology (Third Edition)* (pp. 697-722). New York: Academic Press.
- Williams, J., Boin, N. G., Valera, (2015). Noncanonical roles for Tropomyosin during myogenesis. *142*(19), 3440-3452.
- Willkomm, L. B., Wilhelm %J Cell Fusion: Overviews Methods. (2015). State of the art in cell-cell fusion.
- Wright, W. E., Sassoon, D. A., & Lin, (1989). Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *56*(4), 607-617.
- Wu, J., Akhmanova, A. J. A. r. o. c., & biology, d. (2017). Microtubule-organizing centers.
- Xie, X. N., Chung, H., Sow, C., Wee, R. (2006). Nanoscale materials patterning and engineering by atomic force microscopy nanolithography.
- Xu, B., Magli, A., Anugrah, Y., Koester, S. J., Perlingeiro, R. C., & Shen, W. J. B. (2018). Nanotopography-responsive myotube alignment and orientation as a sensitive phenotypic biomarker for Duchenne Muscular Dystrophy.
- Yiu, E. M., Kornberg, & health, c. (2015). Duchenne muscular dystrophy.
- Yoshioka, K., Ito, A., Horie, M., Ikeda, K., Kataoka, S., Sato, K., . . . Kamihira, M. (2021). Contractile Activity of Myotubes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells: A Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Cells*, *10*(10). doi:10.3390/cells10102556
- Zammit, P. S., Partridge, T. A., & Yablonka-Reuveni, Z. (2006). The Skeletal Muscle Satellite Cell: The Stem Cell That Came in From the Cold. doi:10.1369/jhc.6R6995.2006
- Zanou, N., & Gailly, P. (2013). Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *70*(21), 4117-4130. doi:10.1007/s00018-013-1330-4
- Zatloukal, K., Stumptner, C., Fuchsbichler, A., Fickert, P., Lackner, C., Trauner, M., & Denk, H. (2004). The keratin cytoskeleton in liver diseases. *J Pathol*, *204*(4), 367-376. doi:10.1002/path.1649
- Zhang, S.-Z., Xu, Y., Xie, H.-Q., Li, X.-Q., Wei, Y.-Q., & Yang, Z.-M. J. B. r. (2009). The possible role of myosin light chain in myoblast proliferation.