



HAL
open science

De la caractérisation de la cardiomyopathie dilatée à la modulation à visée thérapeutique des voies de signalisation impliquées dans le phénotype cardiaque de myopathies d'origine génétique.

Ariane Biquand

► To cite this version:

Ariane Biquand. De la caractérisation de la cardiomyopathie dilatée à la modulation à visée thérapeutique des voies de signalisation impliquées dans le phénotype cardiaque de myopathies d'origine génétique.. Sciences agricoles. Université Paris-Saclay, 2020. Français. <NNT : 2020UPASE004>. <tel-05580292>

HAL Id: tel-05580292

<https://theses.hal.science/tel-05580292v1>

Submitted on 4 Apr 2026

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.



HAL Authorization

De la caractérisation de la cardiomyopathie dilatée à la modulation à visée thérapeutique des voies de signalisation impliquées dans le phénotype cardiaque de myopathies d'origine génétique

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 577, Structure et Dynamique des Systèmes Vivants SDSV
Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, Généthon, Inserm, Univ Evry, Intégrare (UMR_S951) Approches génétiques intégrées et nouvelles thérapies pour les maladies rares, 91002, Evry-Courcouronnes, France
Réfèrent : Université d'Évry Val d'Essonne

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 9 juin 2020 par

Ariane BIQUAND

Composition du Jury

Sylvain FISSON

Professeur, Université Paris-Saclay

Président

Onnik AGBULUT

Professeur, Université Paris Sorbonne

Rapporteur & Examineur

Mireille COSSEE

Maîtresse de conférences des universités – praticien hospitalier, HDR, Université de Montpellier

Rapporteur & Examinatrice

Helge AMTHOR

Professeur des universités – praticien hospitalier, Université Paris-Saclay

Examineur

Lucie CARRIER

Professeure, University Medical Center Hamburg-Eppendorf

Examinatrice

Isabelle RICHARD

DR1 CNRS, Université Paris-Saclay

Directrice de thèse

William LOSTAL

Directeur d'études, Genosafe

Co-directeur de thèse

REMERCIEMENTS

En premier lieu je souhaite remercier ma directrice de thèse, le Docteur Isabelle Richard de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma thèse dans son équipe à Généthon. Je la remercie aussi de m'avoir donné la chance de faire une partie de ma thèse en Arizona.

Je remercie également les membres du jury pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de prendre part à ce travail. Mes sincères remerciements vont au Professeur Sylvain Fisson d'avoir accepté la présidence de ma thèse, ainsi que le Professeur Onnik Agbulut et le Docteur Mireille Cossee pour avoir accepté de participer au jury en qualité de rapporteurs. Je remercie également les Professeurs Helge Amthor et Lucie Carrier d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

Je tiens tout particulièrement à remercier William Lostal pour son encadrement, son aide et son soutien pendant ma thèse. Merci d'avoir continué à me motiver quand j'ai eu des coups de mou.

Je remercie le Docteur Henk Granzier et toute son équipe qui m'ont accueillie dans leur laboratoire à Tucson pour ces quelques mois, ça a été une expérience très enrichissante.

J'adresse également mes remerciements les plus chaleureux à tous les membres de l'équipe « Dystrophies des Ceintures » qui ont tous contribué à l'aboutissement de ce travail et qui m'ont permis d'évoluer. Je remercie tout particulièrement Nathalie Bourg-Alibert, avec qui j'ai partagé mon bureau pendant plus de 2 ans, qui m'a beaucoup appris et que j'étais si triste de quitter. Merci à Carinne Roudaut et Laurence Suel-Pétat qui m'ont formé sur bien des manips, et que j'ai aimé importuner pour leur poser des milliers de questions. Merci à tout le reste de la DDC qui m'a également bien aidée : Natalia Domingues, Evelyne Gicquel, David Israeli, Célia Thevenard, Heather Best, Marine Geoffroy, Matteo Bovolenta, Sonia Albini, Karishma Soocheta et Marine Faivre. Je souhaite bon courage à Camille Vaubourg, Ai Vu Hong, Cynthia Daoud et Juliette Lemoine pour leur thèse.

Je remercie également les différentes équipes plateforme pour leur disponibilité et leur aide : l'imagerie, l'expérimentation animale et l'histologie. Et mes souris par la même occasion, sans qui cette thèse n'aurait pas pu être.

Un merci tout particulier à Youna Coquin et Caroline Bogni, mes binômes de thèse. Ensemble nous avons pu partager nos périodes de doutes, de craintes, de joies durant ces années de thèse.

Merci à Antoine Biek, Jérémie Cosette, Jérôme Poupiot et Yohann Dickx de m'avoir beaucoup divertie, et pour toutes nos séances de badminton, qui j'espère pourront bientôt reprendre.

Merci à la Réunion Tup (Adèle, Clémence, Hélène, Janis, Mathilde, Marine et Nina) d'être là depuis toutes ces années, ma vie ne serait clairement pas la même sans vous.

Merci à mes amis de pharma, et surtout Clémence et Delphine qui ont assisté à mes deux thèses !

Merci à mes différents colocataires qui ont dû supporter la rédaction de mes thèses. Et tout particulièrement Eléonore et Rémy qui ont vécu la phase finale de cette rédaction en étant confinés avec moi. Au passage, bigup à Sissy et Adriene de nous avoir aidé à supporter le confinement.

Je remercie particulièrement Elise, ma sœur, et mes parents de toujours croire en moi et de me pousser toujours plus haut ! Merci également à tout le reste de ma famille.

Enfin je souhaite remercier toutes les autres personnes que j'ai pu oublier qui m'ont soutenue et supportée (dans les deux sens du terme) pendant ces presque quatre années ! Et surtout, pas merci au coronavirus par la faute de qui ma soutenance ne s'est pas vraiment passée comme prévu...

Merci à tous 😊

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	- 4 -
SOMMAIRE	- 6 -
LISTE DES FIGURES	- 12 -
LISTE DES TABLES	- 16 -
ABREVIATIONS	- 18 -
INTRODUCTION	- 22 -
I. LES MUSCLES STRIES SQUELETTIQUES ET CARDIAQUE	- 22 -
I.A. Anatomie	- 22 -
I.A.1. Organisation du muscle strié squelettique : de la fibre musculaire au sarcomère	- 22 -
I.A.2. Organisation du muscle cardiaque : les cardiomyocytes et les fibroblastes	- 25 -
I.B. Physiologie de la contraction musculaire	- 27 -
I.B.1. Le muscle strié squelettique	- 27 -
I.B.2. La contraction du muscle squelettique	- 27 -
I.B.3. Le cycle cardiaque	- 29 -
I.B.4. Le tissu nodal et le système cardionecteur	- 30 -
II. LES CARDIOMYOPATHIES DILATEES DANS LES MYOPATHIES D'ORIGINE GENETIQUE	- 31 -
II.A. La cardiomyopathie dilatée	- 31 -
II.A.1. L'atteinte des cardiomyocytes	- 32 -
II.A.2. La fibrose cardiaque	- 34 -
II.A.2.a. Les effecteurs de la fibrose cardiaque	- 34 -
II.A.2.b. Les myofibroblastes	- 36 -
II.A.2.c. Le tissu fibrotique	- 37 -
II.A.3. Les conséquences cliniques	- 38 -
II.B. La titine	- 39 -
II.B.1. Structure et fonction de la titine	- 39 -
II.B.2. Les titinopathies et les DCM associées	- 43 -
II.B.3. Les modèles animaux : le modèle murin DeltaMex5	- 44 -
II.C. La dystrophine	- 45 -
II.C.1. Structure et fonction	- 45 -
II.C.2. Les dystrophinopathies	- 48 -
II.C.2.a. Description clinique	- 48 -
II.C.2.b. Etiologie	- 50 -
II.C.2.c. Pathophysiologie	- 50 -
II.C.3. Les modèles animaux : le modèle murin DBA2-mdx	- 52 -
III. LES APPROCHES THERAPEUTIQUES DANS LES CARDIOMYOPATHIES DILATEES	- 54 -
III.A. La prise en charge actuelle des cardiomyopathies dilatées	- 54 -

<i>III.B. Les nouvelles pistes thérapeutiques</i>	- 55 -
III.B.1. Généralités sur la thérapie génique	- 55 -
III.B.2. Utilisation du vecteur adéno-associé recombinant.....	- 56 -
III.B.3. La thérapie génique ciblant la cascade pathologique des cardiomyopathies dilatées.....	- 58 -
III.B.3.a. Thérapie génique ciblant la voie de signalisation du calcium ou la voie β -adrénergique..	- 59 -
III.B.3.b. Autres cibles de thérapie génique	- 61 -
III.B.4. Thérapie génique ciblant spécifiquement un gène	- 63 -
III.B.5. La thérapie génique dans les cardiomyopathies dilatées liées à la titine.....	- 63 -
III.B.6. La thérapie génique dans la Myopathie de Duchenne	- 63 -
III.B.6.a. Les micro-dystrophines	- 64 -
III.B.6.b. Autres approches de thérapie génique	- 65 -
SUJET ET OBJECTIFS DE LA THESE	- 68 -
MATERIEL ET METHODES	- 70 -
I. MODELES DE SOURIS, PRELEVEMENT DE MUSCLES.....	- 70 -
I.A. <i>Modèles de souris utilisés</i>	- 70 -
I.B. <i>Prélèvement et congélation des muscles</i>	- 70 -
II. HISTOLOGIE	- 71 -
II.A. <i>Coloration Hématoxyline-Phloxine-Safran</i> :	- 71 -
II.B. <i>Coloration Rouge Sirius</i>	- 71 -
II.B.1. Quantification du Rouge Sirius	- 72 -
II.B.1.a. Sirius Quant	- 72 -
II.B.1.b. WEKA.....	- 73 -
II.B.1.c. Reconstitution et quantification sur un cœur entier	- 73 -
II.C. <i>Marquage par immuno-histo fluorescence</i>	- 74 -
II.D. <i>Microscopie à feuille de lumière</i>	- 75 -
II.D.1. Protocole.....	- 75 -
II.D.2. Quantification du volume cardiaque.....	- 76 -
II.E. <i>Microscopie électronique</i>	- 77 -
II.E.1. Immuno-électro microscopie	- 77 -
II.E.2. Microscopie électronique à transmission.....	- 77 -
II.E.3. Mesure des sarcomères	- 77 -
III. ETUDE DE L'ARN.....	- 78 -
III.A. <i>Extraction et quantification des ARN</i>	- 78 -
III.B. <i>Mesure de la qualité des ARN</i>	- 79 -
III.C. <i>PCR quantitative en temps réel</i>	- 79 -
III.C.1. Transcription inverse.....	- 80 -
III.C.2. PCR quantitative en temps réel.....	- 80 -
III.C.3. Expression des résultats	- 81 -
III.C.4. RT2 Profiler PCR Arrays	- 82 -
III.D. <i>Séquençage de l'ARN</i>	- 82 -
III.D.1. RNAseq.....	- 82 -

III.D.2.	Analyse.....	- 82 -
III.D.3.	Représentation graphique	- 83 -
IV.	EXTRACTION DE PROTEINES ET WESTERN BLOT	- 83 -
IV.A.	<i>Isoformes de la Titine et Western Blot Titine</i>	- 83 -
IV.B.	<i>Western Blot classique</i>	- 84 -
IV.C.	<i>Test ELISA</i>	- 85 -
V.	ANALYSE FONCTIONNELLE	- 85 -
V.A.	<i>Analyse de la fonction musculaire</i>	- 85 -
V.B.	<i>Analyse de la fonction cardiaque</i>	- 86 -
V.B.1.	Echographie	- 86 -
V.B.2.	Echographie de stress à la dobutamine	- 87 -
V.B.3.	Mesure de la relation Pression-Volume.....	- 87 -
VI.	VECTEURS VIRAUX	- 87 -
VI.A.	<i>Design des vecteurs</i>	- 87 -
VI.A.1.	GFP-luciférase	- 87 -
VI.A.2.	Candidats	- 88 -
VI.A.3.	Nrf2 et micro-ARN.....	- 89 -
VI.B.	<i>Production des plasmides</i>	- 90 -
VI.C.	<i>Production des vecteurs</i>	- 90 -
VII.	CULTURE CELLULAIRE	- 92 -
VII.A.	<i>Culture</i>	- 92 -
VII.B.	<i>Transfection et transduction des cellules</i>	- 92 -
VII.C.	<i>Marquage par immuno-fluorescence</i>	- 92 -
VIII.	STATISTIQUES.....	- 93 -
	RESULTATS	- 94 -
I.	PREMIERE PARTIE : CARACTERISATION DU MODELE DELTAMEX5	- 94 -
I.A.	<i>Caractérisation morphologique</i>	- 94 -
I.A.1.	Observations générales.....	- 94 -
I.A.2.	Caractérisation histologique	- 96 -
I.A.2.a.	Caractérisation histologique du tissu musculaire squelettique.....	- 96 -
I.A.2.b.	Caractérisation histologique du tissu cardiaque.....	- 97 -
I.A.3.	Caractérisation des différences observées dans la fibrose	- 100 -
I.A.3.a.	Quantification de la fibrose par WEKA	- 100 -
I.A.3.b.	Caractérisation de la fibrose.....	- 102 -
I.A.4.	Caractérisation par Imagerie à feuille de lumière	- 104 -
I.A.5.	Caractérisation en microscopie électronique	- 106 -
I.A.5.a.	Caractérisation en microscopie électronique du tissu musculaire squelettique	- 106 -
I.A.5.b.	Caractérisation en microscopie électronique du tissu musculaire cardiaque	- 107 -
I.B.	<i>Caractérisation fonctionnelle de la souris DeltaMex5</i>	- 109 -
I.B.1.	Caractérisation fonctionnelle du muscle squelettique.....	- 109 -

I.B.1.a.	Force musculaire	- 109 -
I.B.1.b.	Elasticité	- 110 -
I.B.1.c.	Fatigue musculaire	- 111 -
I.B.2.	Caractérisation fonctionnelle cardiaque	- 112 -
I.B.2.a.	Echographie	- 112 -
	Échographie de stress induit par la dobutamine	- 115 -
I.B.2.b.	Mesure de la relation entre la pression intracardiaque et le volume du ventricule.....	- 116 -
I.C.	<i>Caractérisation moléculaire</i>	- 118 -
I.C.1.	Caractérisation moléculaire du muscle squelettique	- 118 -
I.C.1.a.	Marqueurs transcriptionnels tissulaires du processus dystrophique	- 118 -
I.C.1.b.	Analyse protéique de la titine dans le muscle	- 119 -
I.C.2.	Caractérisation moléculaire du muscle cardiaque	- 121 -
I.C.2.a.	Marqueurs transcriptionnels de la cardiomyopathie	- 121 -
I.C.2.b.	Analyse protéique de la titine dans le cœur	- 123 -
I.C.2.c.	Caractérisation de la ligne M	- 125 -
I.D.	<i>Conclusions de la caractérisation du modèle DeltaMex5</i>	- 127 -
II.	DEUXIEME PARTIE : CARACTERISATION DU MODELE DBA/2-MDX.....	- 128 -
III.	TROISIEME PARTIE : IDENTIFICATION DES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS L'ATTEINTE CARDIAQUE-	131 -
III.A.	<i>Analyse RNAseq des deux modèles de cardiomyopathie</i>	- 131 -
III.B.	<i>Validation des gènes dérégulés</i>	- 143 -
IV.	QUATRIEME PARTIE : MODULATION DES VOIES DE SIGNALISATION WNT ET TGF-B ET DES GENES CANDIDATS-	146 -
IV.A.	<i>Inhibiteurs pharmacologiques des voies WNT et TGF-β</i>	- 146 -
IV.A.1.	Evaluation morphologique.....	- 147 -
IV.A.2.	Evaluation fonctionnelle	- 148 -
IV.A.3.	Evaluation moléculaire	- 150 -
IV.A.4.	Conclusion.....	- 152 -
IV.B.	<i>Approches par transfert de gène</i>	- 152 -
IV.B.1.	Sélection des candidats.....	- 152 -
IV.B.2.	Design des vecteurs de transfert de gène.....	- 154 -
IV.B.3.	Modulation des gènes de la voie TGF-β (CILP et LTBP2).....	- 156 -
IV.B.3.a.	Validation in vitro du plasmide hTnt2-hCILP	- 156 -
IV.B.3.b.	Expression des transgènes après transfert de gène	- 157 -
IV.B.3.c.	Evaluation morphologique	- 161 -
IV.B.3.d.	Evaluation fonctionnelle.....	- 163 -
IV.B.3.e.	Evaluation moléculaire	- 164 -
IV.B.4.	Modulation de la voie WNT (WISP2, DKK3 et SFRP2)	- 167 -
IV.B.4.a.	Expression des transgènes après transfert de gène	- 167 -
IV.B.4.b.	Evaluation morphologique	- 168 -
IV.B.4.c.	Evaluation fonctionnelle.....	- 170 -
IV.B.4.d.	Evaluation moléculaire	- 171 -
IV.B.5.	Conclusion.....	- 172 -
IV.C.	<i>Approches complémentaires en transfert de gène</i>	- 173 -

IV.C.1. Surexpression du facteur de transcription antioxydant Nrf2.....	- 173 -
IV.C.1.a. Evaluation morphologique	- 173 -
IV.C.1.b. Evaluation fonctionnelle.....	- 174 -
IV.C.1.c. Conclusion	- 175 -
IV.C.2. Les micro ARN	- 175 -
IV.C.2.a. Evaluation morphologique	- 176 -
IV.C.2.b. Evaluation fonctionnelle.....	- 178 -
IV.C.2.c. Conclusion	- 179 -
IV.C.3. Conclusion.....	- 179 -
DISCUSSION ET CONCLUSION	- 181 -
I. CARACTERISATION DU MODELE DELTAMEX5	- 181 -
I.A. <i>L'atteinte cardiaque du modèle DeltaMex5 est caractérisée par une cardiomyopathie dilatée</i>	- 181 -
I.B. <i>Le phénotype musculaire du modèle est limité</i>	- 183 -
I.C. <i>Analyse protéique de la titine</i>	- 184 -
II. CARACTERISATION DU MODELE DBA/2-MDX.....	- 186 -
III. IDENTIFICATION DES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS L'ATTEINTE CARDIAQUE	- 187 -
IV. MODULATION DES VOIES DE SIGNALISATION WNT ET TGF- β ET DES GENES CANDIDATS.....	- 190 -
IV.A. <i>L'inhibition pharmacologique des voies améliore la dilatation ventriculaire et la fonction</i> <i>cardiaque</i>	- 190 -
IV.B. <i>Transfert de gène</i>	- 191 -
V. CONCLUSION GENERALE.....	- 193 -
ANNEXES.....	- 195 -
BIBLIOGRAPHIE	- 199 -

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Anatomie du muscle strié squelettique et structure de la fibre musculaire : Du muscle au sarcomère.	- 23 -
Figure 2 : Le sarcomère.	- 24 -
Figure 3 : Anatomie du cœur en coupe longitudinale.	- 25 -
Figure 4 : Le cardiomyocyte contractile.	- 26 -
Figure 5 : La propagation du potentiel d'action.	- 28 -
Figure 6 : Les étapes du cycle cardiaque.	- 29 -
Figure 7 : Le système cardionecteur.	- 30 -
Figure 8 : Représentation des principales protéines du cytosquelette, localisation de la titine et de la dystrophine.	- 31 -
Figure 9 : La cardiomyopathie dilatée.	- 32 -
Figure 10 : La différenciation du fibroblaste en myofibroblaste.	- 37 -
Figure 11 : La fibrose.	- 38 -
Figure 12 : La titine.	- 40 -
Figure 13 : La ligne M de la titine.	- 42 -
Figure 14 : Principales isoformes de la titine.	- 42 -
Figure 15 : Localisation sur le gène de la titine des mutations responsables de titinopathies chez l'Homme.	- 43 -
Figure 16 : RT-PCR montrant l'expression des isoformes de la titine Mex5+ et Mex5- selon les muscles.	- 45 -
Figure 17 : Structure du gène de la dystrophine.	- 46 -
Figure 18 : La dystrophine et le DAPC.	- 48 -
Figure 19 : Dégénération du muscle strié squelettique dans la DMD.	- 51 -
Figure 20 : Le virus adéno-associé à l'état sauvage et sous une forme recombinée.	- 57 -
Figure 21 : Entrée et trafic du virus AAV dans la cellule.	- 57 -
Figure 22 : Les cibles de la thérapie génique pour le traitement de l'insuffisance cardiaque.	- 58 -
Figure 23 : Les différentes constructions de micro-dystrophine en essai clinique.	- 64 -
Figure 24 : Principe de la réfringence du collagène en lumière polarisée.	- 72 -
Figure 25 : Principe de la microscopie à feuille de lumière.	- 76 -
Figure 26 : Mesure de la longueur des sarcomères.	- 78 -
Figure 27 : Plasmide pTnt2-GFP-Luciférase.	- 88 -
Figure 28 : Carte du plasmide shRNA 4 en 1 mCILP-GFP.	- 89 -
Figure 29 : Mesure de la masse des souris en fonction de l'âge.	- 95 -
Figure 30 : Mesure de la masse du cœur en fonction de l'âge et normalisation de la masse du cœur en fonction de la masse totale de la souris.	- 95 -
Figure 31 : Caractérisation histologique musculaire.	- 97 -
Figure 32 : Caractérisation histologique du cœur.	- 99 -

<i>Figure 33 : Répartition de la fibrose dans le cœur des souris DeltaMex5.</i>	- 100 -
<i>Figure 34 : Différentes techniques de quantification du Rouge Sirius.</i>	- 101 -
<i>Figure 35 : Quantification de la coloration au Rouge Sirius par WEKA.</i>	- 102 -
<i>Figure 36 : Observation du Rouge Sirius.</i>	- 102 -
<i>Figure 37 : Caractérisation de la fibrose.</i>	- 103 -
<i>Figure 38 : Imagerie du cœur par microscopie à feuille de lumière.</i>	- 104 -
<i>Figure 39 : Exemples de marquage de cœur observés par imagerie à feuille de lumière, marquages de la dystrophine et de la connexine 43.</i>	- 105 -
<i>Figure 40 : Quantification du volume ventriculaire par microscopie à feuille de lumière.</i>	- 106 -
<i>Figure 41 : Observation du muscle soléaire en microscopie électronique.</i>	- 107 -
<i>Figure 42 : Observation du muscle papillaire cardiaque en microscopie électronique.</i>	- 109 -
<i>Figure 43 : Mesure de la force musculaire.</i>	- 110 -
<i>Figure 44 : Mesure de l'étirement passif des muscles soléaires et EDL.</i>	- 111 -
<i>Figure 45 : Résistance à la fatigue musculaire après stimulation répétée des muscles SOL et EDL.</i>	- 112 -
<i>Figure 46 : Evolution des principaux marqueurs mesurés en échographie au cours du temps.</i>	- 115 -
<i>Figure 47 : Echographies de stress induit par la Dobutamine.</i>	- 116 -
<i>Figure 48 : La boucle de relation Pression / Volume.</i>	- 117 -
<i>Figure 49 : Analyse de la boucle Pression/Volume.</i>	- 117 -
<i>Figure 50 : Mesure RT-qPCR de différents marqueurs ARN de l'atteinte musculaire.</i>	- 118 -
<i>Figure 51 : Les ratios protéiques musculaire.</i>	- 119 -
<i>Figure 52 : Western Blot de la ligne M de la titine.</i>	- 120 -
<i>Figure 53 : Marqueurs transcriptionnels de la cardiomyopathie ;</i>	- 122 -
<i>Figure 54 : Les ratios protéiques des différents isoformes de la titine.</i>	- 123 -
<i>Figure 55 : Western Blot de la ligne M de la titine.</i>	- 124 -
<i>Figure 56 : Visualisation sur Integrative Genomic Viewer (IGV) des reads alignés sur le génome murin.</i>	- 125 -
<i>Figure 57 : Marquage immuno-histo fluorescent de N2B et des domaines terminaux de la titine M8M9, is7 et M10.</i>	- 125 -
<i>Figure 58 : Immuno-electro microscopie.</i>	- 126 -
<i>Figure 59 : Marquage immuno-histo fluorescent de partenaires du domaine M10, l'α-synémine, la myosprine et l'obscurine.</i>	- 127 -
<i>Figure 60 : Mesure de la masse des souris en fonction de l'âge.</i>	- 128 -
<i>Figure 61 : Caractérisation histologique du cœur.</i>	- 129 -
<i>Figure 62 : Caractérisation échographique de la souris DBA/2-mdx.</i>	- 129 -
<i>Figure 63 : Caractérisation de la souris DBA/2-mdx.</i>	- 130 -
<i>Figure 64 : Volcano plots DeltaMex5.</i>	- 133 -
<i>Figure 65 : Volcano Plots DBA/2-mdx.</i>	- 136 -
<i>Figure 66 : Diagramme de Venn des résultats de RNAseq.</i>	- 138 -
<i>Figure 67 : Analyses des voies de signalisation avec Ingenuity Pathway Analysis.</i>	- 140 -

<i>Figure 68 : Analyse des voies de signalisation avec PANTHER dans le cœur des souris DeltaMex5 et DBA/2-mdx à 4 et 6 mois.....</i>	<i>- 141 -</i>
<i>Figure 69 : Les différentes voies de signalisation WNT.....</i>	<i>- 142 -</i>
<i>Figure 70 : Analyse de qPCR de plusieurs gènes dérégulés dans le RNAseq.....</i>	<i>- 145 -</i>
<i>Figure 71 : Masse totale des souris en fonction du groupe et ratio de la masse du cœur en fonction de la masse totale de la souris (%)......</i>	<i>- 147 -</i>
<i>Figure 72 : Caractérisation histologique du cœur après traitement par de SB431542 et XAV939 des souris DeltaMex5.....</i>	<i>- 148 -</i>
<i>Figure 73 : Comparaison des principaux paramètres mesurés en échographie entre les souris C57BL/6, les souris DeltaMex5 non injectées et les souris DeltaMex5 traitées par les inhibiteurs à 4 mois.....</i>	<i>- 149 -</i>
<i>Figure 74 : Analyse RT2 profiler PCR array sur les souris traitées pas les inhibiteurs pharmacologiques.....</i>	<i>- 152 -</i>
<i>Figure 75 : Test in vitro du vecteur hTnt2-GFP-luciférase.....</i>	<i>- 155 -</i>
<i>Figure 76 : Analyses de bioluminescence.....</i>	<i>- 156 -</i>
<i>Figure 77 : Transfection des cellules HL-1 par le plasmide hTnt2-hCILP.....</i>	<i>- 157 -</i>
<i>Figure 78 : Expression des transgènes et des gènes endogènes CILP et LBTP2.....</i>	<i>- 158 -</i>
<i>Figure 79 : Western blot dirigé contre la protéine CILP.....</i>	<i>- 159 -</i>
<i>Figure 80 : Analyse de l'expression de CILP.....</i>	<i>- 160 -</i>
<i>Figure 81 : Analyse morphologique.....</i>	<i>- 161 -</i>
<i>Figure 82 : Caractérisation histologique du cœur après traitement par AAV9-hTnt2-hCILP, AAV9-shCILP ou AAV-shLTBP2 des souris DeltaMex5 et des contrôles injectés en PBS.....</i>	<i>- 163 -</i>
<i>Figure 83 : Comparaison des marqueurs de la DCM mesurés en échographie entre les souris C57BL/6, les souris DeltaMex5 et les souris DeltaMex5 injectées par les vecteurs CILP, shCILP et shLBTP2.....</i>	<i>- 164 -</i>
<i>Figure 84 : Mesure RT-qPCR de différents marqueurs ARN de l'atteinte cardiaque.....</i>	<i>- 165 -</i>
<i>Figure 85 : Mesure RT-qPCR de différents marqueurs ARN de la fibrose cardiaque.....</i>	<i>- 166 -</i>
<i>Figure 86 : Analyse RT2 profiler PCR array sur les souris traitées par hCILP.....</i>	<i>- 167 -</i>
<i>Figure 87 : Expression des transgènes et des gènes endogènes WISP2, DKK3 et SFRP2.....</i>	<i>- 168 -</i>
<i>Figure 88 : Masse totale des souris et mesure de l'hypertrophie cardiaque.....</i>	<i>- 168 -</i>
<i>Figure 89 : Caractérisation histologique du cœur après traitement par AAV9-hTnt2-hWISP2, DKK3 ou SFRP2 des souris DeltaMex5.....</i>	<i>- 170 -</i>
<i>Figure 90 : Comparaison des marqueurs de la DCM mesurés en échographie entre les souris C57BL/6, les souris DeltaMex5 et les souris DeltaMex5 injectées par les vecteurs WISP2, DKK3 et SFRP2.....</i>	<i>- 170 -</i>
<i>Figure 91 : Mesure RT-qPCR de différents marqueurs ARN de l'atteinte cardiaque et fibrotique dans l'étude WNT.....</i>	<i>- 172 -</i>
<i>Figure 92 : Masse totale des souris en fonction du groupe et ratio de la masse du cœur en fonction de la masse totale de la souris (%)......</i>	<i>- 174 -</i>
<i>Figure 93 : Caractérisation histologique du cœur après traitement par AAV9-tnnt2-NRF2 des souris DeltaMex- 174 -</i>	<i>- 174 -</i>
<i>Figure 94 : Comparaison des marqueurs de la DCM mesurés en échographie entre les souris C57BL/6, les souris DeltaMex5 non injectées et les souris DeltaMex5 sur exprimant Nrf2.....</i>	<i>- 175 -</i>

Figure 95 : Masse totale des souris en fonction du groupe et ratio de la masse du cœur en fonction de la masse totale de la souris (%)...... - 177 -

Figure 96 : Caractérisation histologique du cœur après traitement par les vecteurs micro ARN miR-101a, miR133a, miR384 et miR590 des souris DeltaMex5...... - 178 -

Figure 97 : Comparaison des marqueurs de la DCM mesurés en échographie entre les souris C57BL/6, les souris DeltaMex5 non injectées, injectée par un miR-contrôle et les souris DeltaMex5 sur exprimant les différents micro ARN. - 178 -

LISTE DES TABLES

<i>Tableau 1 : Protéines responsables de cardiomyopathies dilatées.</i>	- 33 -
<i>Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés en immuno-histologie.</i>	- 74 -
<i>Tableau 3 : Liste des anticorps utilisés pour la microscopie à feuille de lumière</i>	- 75 -
<i>Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés en immuno-électro microscopie.</i>	- 77 -
<i>Tableau 5 : Mélange réactionnel pour la transcription inverse.</i>	- 80 -
<i>Tableau 6 : Mélange réactionnel pour la PCR quantitative.</i>	- 81 -
<i>Tableau 7 : Liste des amorces Taqman Gene Expression utilisées.</i>	- 81 -
<i>Tableau 8 : Liste des anticorps utilisés en Western blot.</i>	- 84 -
<i>Tableau 9 : Séquences shRNA.</i>	- 89 -
<i>Tableau 10 : Liste des anticorps utilisés en immunofluorescence.</i>	- 93 -
<i>Tableau 11 : Evolution des principaux marqueurs mesurés en échographie au cours du temps.</i>	- 113 -
<i>Tableau 12 : RT2 profiler PCR array Mitochondrie.</i>	- 122 -
<i>Tableau 13 : Top 30 des gènes les plus dérégulés dans le cœur du modèle DeltaMex5 à 4 mois.</i>	- 134 -
<i>Tableau 14 : Top 30 des gènes les plus dérégulés dans le cœur du modèle DBA/2-mdx à 6 mois.</i>	- 136 -
<i>Tableau 15 : Dérégulation de plusieurs gènes d'intérêt dans les modèles.</i>	- 144 -
<i>Tableau 16 : RT2 profiler PCR array WNT targets. DeltaMex5 versus C57BL6.</i>	- 150 -
<i>Tableau 17 : RT2 profiler PCR array TGF-β targets.</i>	- 151 -
<i>Tableau 18 : Résultats de la modulation des voies WNT et TGF-β.</i>	- 172 -
<i>Tableau 19 : Résultats de la modulation de NRF-2 et des miR.</i>	- 179 -

ABREVIATIONS

αSMA : actine alpha du muscle lisse	DAPC : complexe protéique lié à la dystrophine
AAV : virus adéno-associé	DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
AAVr : virus adéno-associé recombinant	DCM : cardiomyopathie dilatée
AMM : autorisation de mise sur le marché	DHPR : récepteur de la dihydropyridine
AC6 : adénylyl-cyclase de type 6	DKK3 : Dickkopf related protein-3
ACh : acétylcholine	DMD : dystrophie musculaire de Duchenne
ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine	DTT : dithiothréitol
ADN : acide désoxyribonucléique	EDL : muscle long extenseur des orteils
ALK : activin receptor-like kinase	EDTA : Éthylènediaminetétraacétique
ANP : peptide natriurétique atrial	FAM : 6-carboxyfluorescéine
APC : adenomatous polyposis coli	FC : différence d'expression (fold change)
ARCV : cardiomyopathie arythmogène du ventricule droit	FPKM : fragments par kb par million de reads
ARN : acide ribonucléique	Fz : frizzled
ARNm : ARN messenger	ITR : répétition inversée terminale
ATP : adénosine triphosphate	kb : kilobase
BAG3 : athanogène associé à Bcl2-3	kDa : kilo Dalton
Bcl2 : lymphoma à cellules B	LGMD2J : dystrophie musculaire des ceintures de type 2j
β-AR : récepteur bêta-adrénérique	LTBP : Latent-Transforming growth factor Beta-binding Protein
BMD : dystrophie musculaire de Becker	GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
BSA : albumine sérique bovine	GRK : protéine G couplée au récepteur kinase
CamKII : kinase dépendante du calcium et de la calmoduline II	GSK-3β : glycogène synthase kinase 3 β
cAMP : 3',5'-cyclic-adenosine monophosphate	HCM : cardiomyopathie hypertrophique
CCN2 ou CTGF : facteur de croissance du tissu connectif	HO-1 : hème oxygénase
CILP : Cartilage Intermediate Layer Protein	HPS : hématoxyline phloxine safran
CK : créatine kinase	HSP : protéines de choc thermique
CRISPR/Cas9 : clustered regular interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated protein 9	I-1C : inhibiteur 1

IEC : inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
IEM : immuno-électro microscopie
IL : interleukine
LB : lysogeny broth
lncRNA : long ARN non codant
LTBP : latent TGF- β -binding protein
LRP : corécepteur lipoprotéique
MAPK : protéine kinase activée par la mitogenèse
MEC : matrice extracellulaire
MCAD : chaîne médiane de l'Acyl-coenzyme A déshydrogénase
MD : micro-dystrophine
miRNA : micro ARN
MHC : chaîne lourde de la myosine
MMP : métalloprotéinases de la matrice
MURF : muscle specific ring finger protein
MyBP-C :
NF- κ B : facteur nucléaire kappa B
nNOS : oxyde nitrique synthase neuronale
NRF2/NFE2L2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
PBS : solution saline en tampon phosphate
PCSA : rapport à la surface de section physiologique
PKC : protéine kinase C
PLN : phospholamban
PI3K : phosphoinositide 3-kinase
PP1 : protéine phosphatase
PVDF : polyvinylidene difluoride
RCM : cardiomyopathie restrictive

RIN : RNA Integrity Number
RPLP0 : gène de l'acide ribophosphoprotéique
RyR : récepteur à la ryanodine
SERCA : pompe calcique ATPase sarcoplasme/endoplasme
SFRP2 : Secreted Frizzled-Related Protein-2
shRNA : petit ARN en épingle à cheveux
SOC : super optimal broth
SOL : muscle soléaire
SUMO1 : petit modificateur 1 lié à l'ubiquitine
TA : muscle tibial antérieur
TAE : Tris, Acétate, EDTA
TBS : tampon tris salin
TIMP : inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases
TK : domaine sérine/thréonine kinase
TGF : facteur de croissance transformant
TLR : récepteur de type toll
TMD : dystrophie musculaire tibiale
TNF- α : facteur de nécrose tumorale alpha
TTN : titine
Tnnt2/cTnT : troponine T cardiaque
VEGF : facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire
vg : genome viral
VIC : 2'-chloro-7'phenyl-1,4-dichloro-6-carboxy-fluorescein
WISP2 : WNT1 inducible signaling pathway protein 2
XLDCM : cardiomyopathie liée à l'X

INTRODUCTION

I. Les muscles striés squelettiques et cardiaque

Il existe trois types de muscle : les muscles striés squelettiques, le muscle strié cardiaque et les muscles lisses. Les deux premières catégories doivent leur nom à l'aspect strié des muscles à l'observation macroscopique. Les muscles sont composés du tissu musculaire et du tissu conjonctif qui l'entoure. Ils sont parcourus d'un réseau nerveux permettant l'arrivée d'informations ainsi que d'un réseau de capillaires sanguins indispensable à l'apport d'oxygène au muscle. Les muscles striés squelettiques sont responsables des mouvements volontaires, de la fonction de locomotion ainsi que du maintien postural. Ils sont sous contrôle du système nerveux somatique. Le muscle cardiaque, ou myocarde, est un muscle creux qui représente la partie du cœur capable de se contracter. Il assure la distribution du sang dans tout l'organisme. Il est soumis à un contrôle involontaire exercé par le système nerveux végétatif, tout comme les muscles lisses. En parallèle de sa fonction contractile, le muscle squelettique a un rôle important dans la régulation énergétique de l'organisme, notamment dans l'homéostasie glucidique, protéique et lipidique. Dans cette introduction, l'anatomie et la fonction contractile des muscles squelettiques et cardiaque seront abordés.

I.A. Anatomie

I.A.1. Organisation du muscle strié squelettique : de la fibre musculaire au sarcomère

Le muscle strié squelettique est composé principalement d'une association de faisceaux musculaires, eux même composés des fibres musculaires : les myofibres. Des cellules dites satellites, cellules myogéniques à l'état quiescent, sont situées en périphérie des fibres musculaires. Elles ont la capacité d'assurer la croissance des fibres et leur régénération. D'autres cellules participent également à l'organisation du tissu musculaire, comme les fibroblastes, les adipocytes et certaines cellules du système immunitaire.

Chez l'Homme, les fibres ont un diamètre variant de 10 à 100 μm et une longueur pouvant atteindre 30 cm. Les fibres correspondent à des myotubes polynucléés qui se forment au cours du développement par la fusion de myoblastes. Dans la situation normale, les noyaux des myofibres se

Introduction

situent en périphérie de la cellule, accolés à la membrane plasmique. Au sein de ces myofibrilles se trouvent les myofibrilles, d'un diamètre de 1 à 3 μm et d'une longueur identique à la fibre, qui réunissent des chaînes de sarcomères, l'unité fonctionnelle contractile du muscle (Figure 1).

Les fibres sont entourées d'une membrane plasmique, le sarcolemme, qui s'invagine pour créer les tubules transverses (les tubules-T). Le réticulum sarcoplasmique forme un fin réseau membranaire qui entoure les myofibrilles, et sert de réservoir de calcium intracellulaire. A son extrémité, le réticulum forme des citernes terminales, renflements impliqués dans la libération du calcium. Les triades sont définies par l'association de deux citernes terminales et d'un tubule-T. Elles permettent de conduire le potentiel d'action au cœur des fibres (Figure 1).

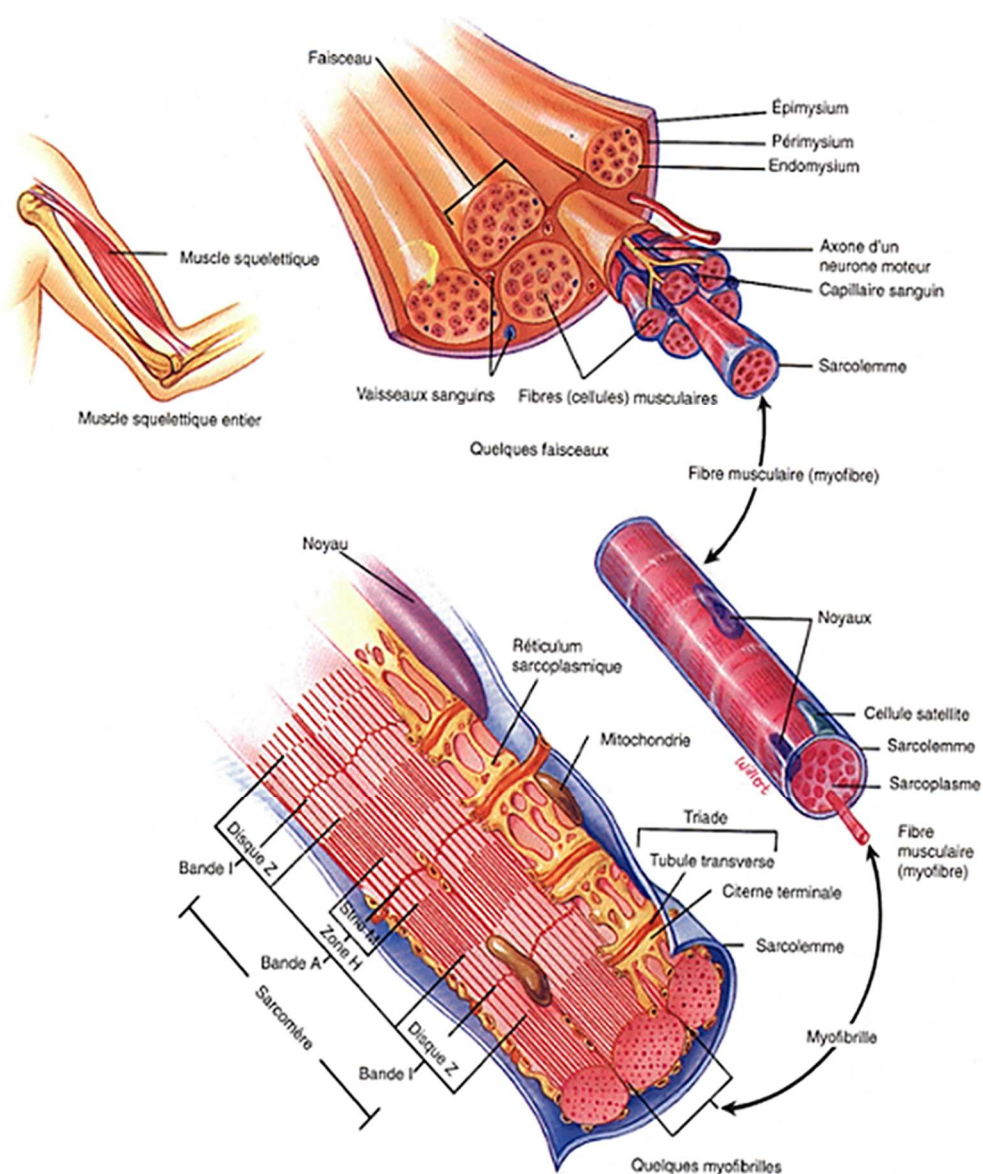


Figure 1 : Anatomie du muscle strié squelettique et structure de la fibre musculaire : Du muscle au sarcomère.

Adapté d'après Tortora 2001 (Tortora and Reynolds Grabowski, 2001).

Introduction

Les sarcomères sont l'unité contractile du muscle. Ils sont composés de myofilaments fins d'actine, de filaments épais de myosine, ainsi que des filaments de titine, une protéine élastique, et d'un ensemble d'autres protéines. Les filaments fins sont constitués de deux chaînes d'actine F enroulées en double hélice associées à des molécules de tropomyosine et de troponine. Les filaments épais sont constitués de 150 à 360 molécules de myosine enroulées en torsade. Chaque molécule de myosine possède une tête scindée en deux, comportant les sites de liaison pour l'actine et pour l'adénosine triphosphate (ATP). Ces filaments sont également liés à d'autres protéines, telles que la nébuline et l' α -actinine (Figure 2).

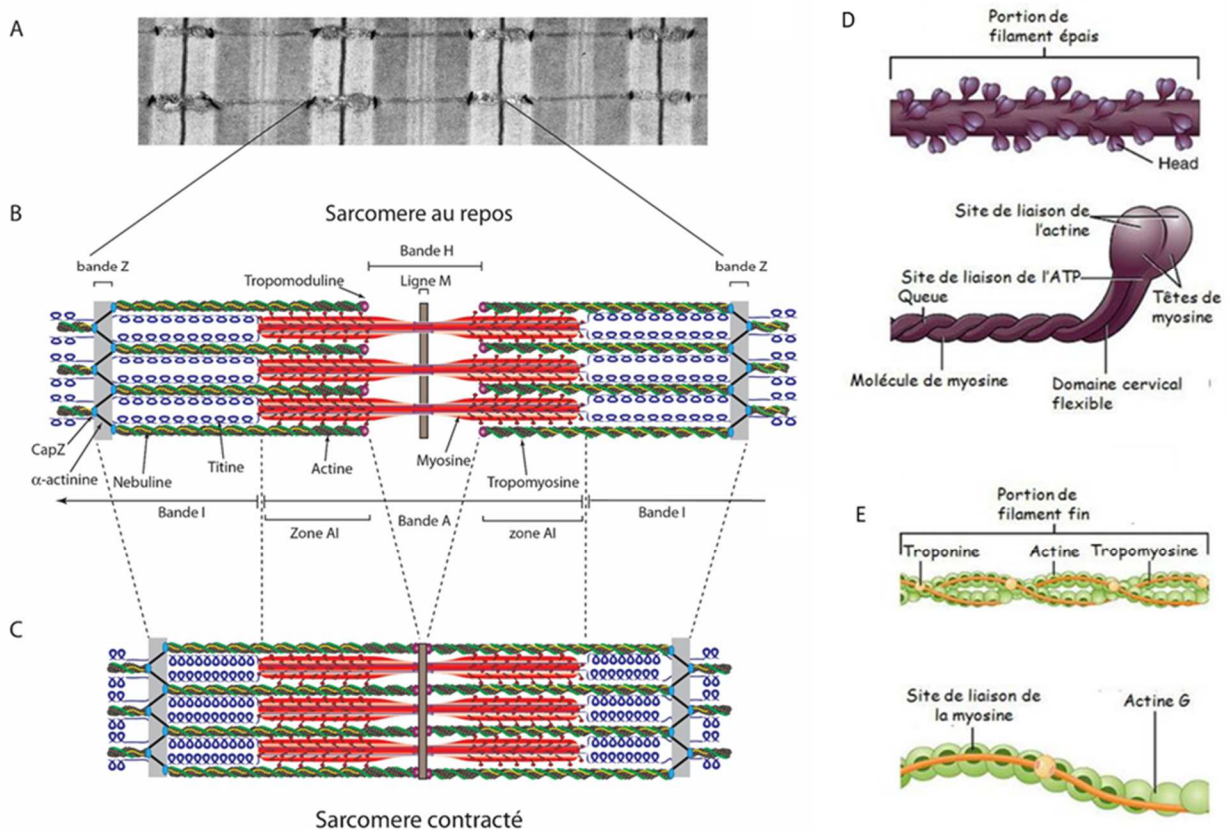


Figure 2 : Le sarcomère.

A) Image d'un sarcomère prise en microscopie électronique. B) Schéma d'un sarcomère au repos. C) Sarcomère contracté. D) Le filament épais de myosine. E) Le filament fin d'actine. Adapté d'après Cadot 2016 (Cadot and Gomes, 2016).

Un sarcomère est délimité entre deux stries Z, constituées en particulier par l'interpénétration des filaments fins de deux sarcomères adjacents. La bande I (isotrope) est caractérisée par les filaments fins. La bande A (anisotrope) est composée de 2 zones AI correspondant au chevauchement des filaments fins et épais et la bande centrale H qui correspond au filament épais de myosine seul. La strie M, située au centre de la bande H est un renflement des filaments épais, les têtes de myosine liées entre elles. La titine s'étend de la strie Z à la bande H. A noter que les tubules T s'invaginent à la jonction des bandes A et I du sarcomère. A noter également, qu'il existe au niveau des lignes Z et M des régions

associées au sarcolemme appelés costamères qui sont impliqués dans la transmission de la force de l'appareil contractile à la matrice extracellulaire, transférant ainsi la force aux fibres musculaires adjacentes et permettant une stabilité mécanique aux muscles pendant la contraction.

1.A.2. Organisation du muscle cardiaque : les cardiomyocytes et les fibroblastes

Le cœur comporte 4 cavités et peut être divisé en cœur droit et cœur gauche. Chacune de ces moitiés est composé d'une oreillette qui reçoit le sang des veines et d'un ventricule qui éjecte le sang vers les artères. Les cavités du cœur gauche sont séparées par la valve mitrale, tandis que celles du cœur droit sont séparées par la valve tricuspide. Les valves aortique et pulmonaire séparent les ventricules des artères.

Le cœur est constitué principalement de cellules endothéliales, qui forment le péricarde et l'endocarde, de cardiomyocytes et de fibroblastes. Les cellules endothéliales représentent plus de 60% des cellules cardiaques. Le péricarde est l'enveloppe séreuse externe du cœur, il est composé d'un feuillet viscéral adhérent au muscle cardiaque et d'un feuillet pariétal, l'épicarde. L'endocarde tapisse quant à lui la face interne de cavités cardiaques. La partie musculaire du cœur située entre le péricarde et l'endocarde est appelée le myocarde (Figure 3). Les cardiomyocytes quant à eux représentent 30 % des cellules cardiaques, tandis que les fibroblastes représentent seulement 11 % de ces cellules (Pinto et al., 2016).

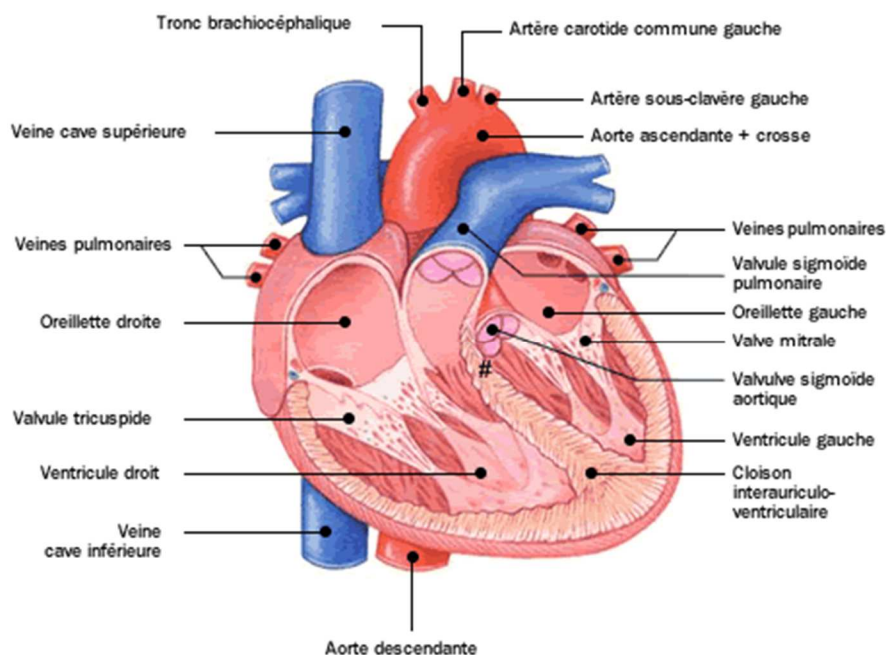


Figure 3 : Anatomie du cœur en coupe longitudinale.
(Mariéb, 1999).

Introduction

Il existe trois types de cardiomyocytes : les cardiomyocytes contractiles, les cellules cardionectrices, spécialisées dans l'initiation et la conduction de l'excitation, et les cellules myoendocrines (Marieb, 1999). Ces dernières sont pauvres en myofibrilles et possèdent une fonction endocrine. Elles sont à l'origine de la sécrétion de peptides natriurétiques impliqués dans la régulation du volume sanguin et dans la composition électrolytique du liquide extracellulaire. Chez l'Homme, les cardiomyocytes contractiles mesurent 120 μm de long et font de 20 à 30 μm de diamètre. Contrairement aux fibres du muscle squelettique, chaque cardiomyocyte contractile possède un seul noyau central, et une plus grande abondance de mitochondries et de grains de glycogènes. Les cardiomyocytes ont une forme cylindrique, et présentent des ramifications en X à leurs extrémités afin de former un réseau tridimensionnel complexe. Ils sont interconnectés par des disques intercalaires constitués des desmosomes et des *zonula adhaerens* qui permettent l'adhésion des cellules entre elles ainsi que des jonctions communicantes qui créent des ponts de faible résistance et permettent la transmission intracellulaire directe des signaux contractiles. Le réticulum sarcoplasmique est moins développé que dans les cellules musculaires squelettiques. Il présente une structure en diade, association d'un tubule-T et d'une seule citerne de calcium, localisée au niveau du disque Z du sarcomère (Figure 4). Contrairement aux myoblastes, les cardiomyocytes contractiles ont une très faible capacité de régénération à l'âge adulte, de l'ordre de 0,5 à 1% (Bergmann et al., 2009; Eschenhagen et al., 2017).

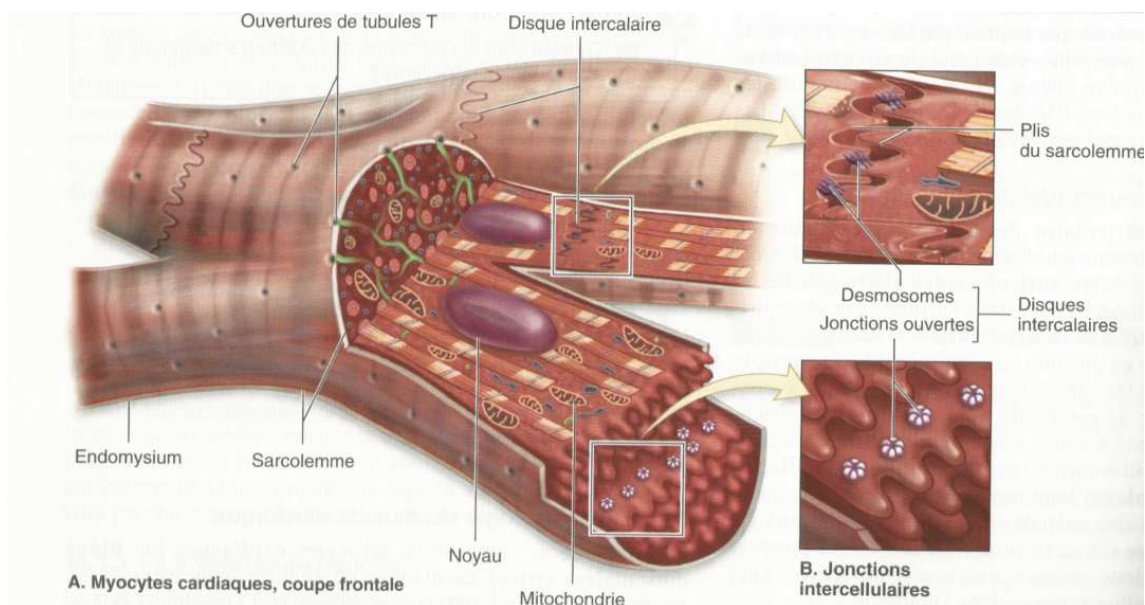


Figure 4 : Le cardiomyocyte contractile.

A) Coupe frontale de myocyte cardiaque. B) Agrandissements de jonctions intercellulaires (McKinley et al., 2014).

Les fibroblastes cardiaques ont un rôle primordial dans le développement cardiaque et le remodelage tissulaire. Ils sont également impliqués dans le maintien de l'intégrité du cœur et sa fonction. Les fibroblastes présentent une haute résistance membranaire, ce qui en fait des bons

conducteurs pour le potentiel d'action. Ce ne sont pas des cellules excitables. Les jonctions cellulaires entre les fibroblastes et les cardiomyocytes se font notamment grâce aux connexines 43 et 45 (Gaudesius et al., 2003). Les fibroblastes forment un réseau de cellules dans la matrice extracellulaire (MEC). Ce sont les principales cellules sécrétrices des protéines de la MEC. Ils sont également responsables de sa dégradation. Les métalloprotéinases de la matrice (MMP) contrôlent la dégradation de la MEC. Leur action est en balancée par les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMP). La MEC du cœur est principalement composée de collagènes et de fibronectine. Elle forme un maillage architectural servant de support aux cardiomyocytes. Les principales fibres de collagène sécrétées par les fibroblastes sont les collagènes I et III qui comptent pour environ 80 % et 10 % du collagène. Le collagène I apporte la rigidité à la MEC, tandis que le collagène III apporte plus d'élasticité (Weber, 1989) (Collier et al., 2012). La fibronectine est la principale protéine extracellulaire associée avec la membrane plasmique externe des cardiomyocytes et des fibroblastes par le biais de l'intégrine qui transmet la force mécanique dans les cardiomyocytes (Engel and Furthmayr, 1987).

I.B. Physiologie de la contraction musculaire

I.B.1. Le muscle strié squelettique

Il existe deux types de fibres musculaires d'un point de vue de leur métabolisme :

Les fibres de type I, dites lentes, ont la capacité de se contracter de façon prolongée mais avec peu d'intensité, elles sont adaptées à des efforts d'endurance. Leur métabolisme est de type oxydatif. Elles sont riches en mitochondries et en myoglobine et possèdent une activité aérobie : leur énergie sous forme d'ATP provient de la réduction des acides gras ou de la conversion du glucose en lactate.

Les fibres de type II, dites rapides, sont plus adaptées à des efforts intenses de courte durée. Elles sont divisées en deux catégories, les fibres glycolytiques qui ont une activité anaérobie stricte et les fibres oxydatives-glycolytiques qui ont un métabolisme intermédiaire entre les fibres oxydatives de type I et les fibres glycolytiques de type II. Elles tirent leur énergie du glycogène stocké dans la cellule qui est converti en glucose au cours de la glycolyse.

I.B.2. La contraction du muscle squelettique

La contraction musculaire est provoquée par la dépolarisation électrique de la membrane plasmique suite à la réception d'un influx nerveux. Le message nerveux moteur provient du cortex cérébral, il est propagé jusqu'à la moelle épinière où la transmission du potentiel d'action se fait avec le neurone moteur ou motoneurone. Une unité motrice est constitué d'un motoneurone et des fibres

qu'il innerve. Le motoneurone possède son corps cellulaire au niveau de la corne antérieure de la moelle épinière, les arborisations terminales de son axone rentrent en contact avec les fibres musculaires au niveau de la jonction neuromusculaire. La transmission du potentiel d'action entre les motoneurones et les fibres musculaires se fait par l'intermédiaire de l'acétylcholine libéré dans la fente synaptique. La liaison de ce neurotransmetteur à son récepteur situé sur le sarcolemme provoque l'excitation. Le potentiel d'action se propage le long de la membrane et des tubules-T (Figure 5).

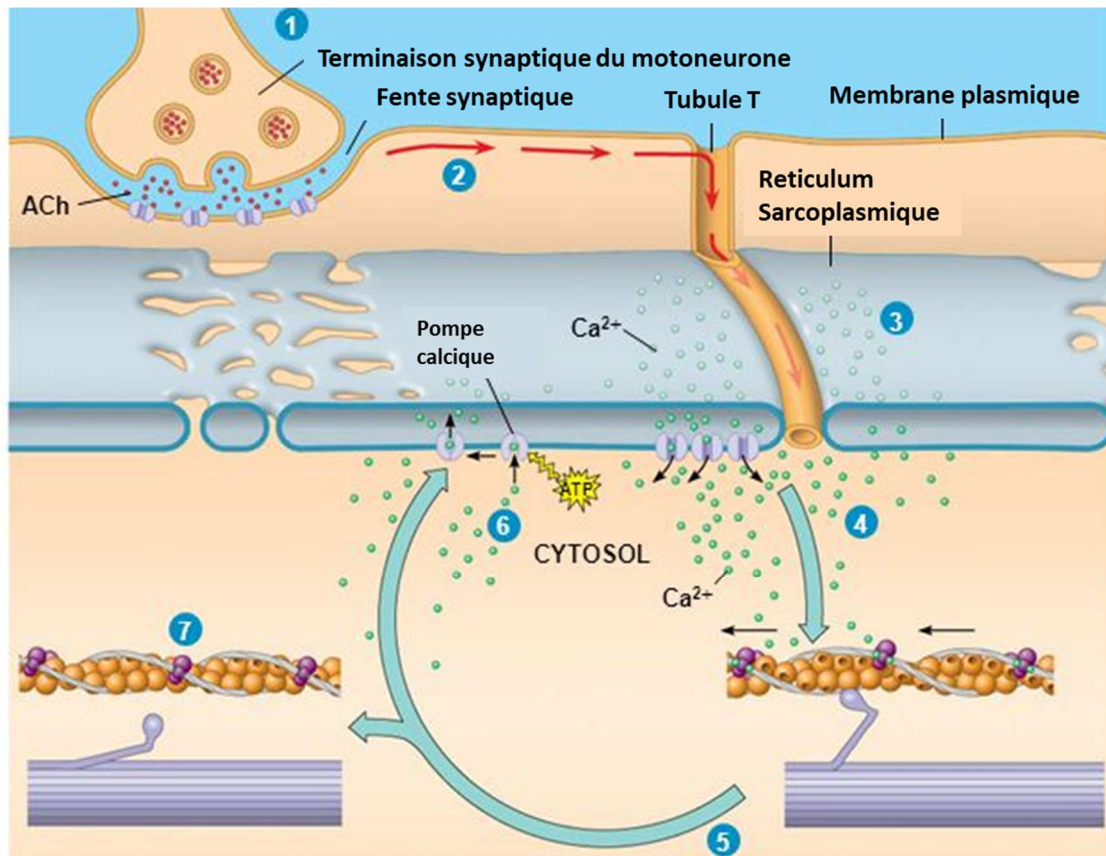


Figure 5 : La propagation du potentiel d'action.

1) L'acétylcholine (ACh) relarguée au niveau de la terminaison synaptique diffuse à travers la fente synaptique pour se fixer à ses récepteurs situés au niveau de la membrane plasmique de la fibre musculaire. 2) Le potentiel d'action est propagé le long de la membrane plasmique jusqu'au tubules T. 3) Le potentiel d'action déclenche le relargage des ions calciques Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique. 4) Le Ca^{2+} se fixe sur la troponine des filaments fins, les têtes de myosine sont exposées. 5) Les filaments fins d'actine sont tirés vers le centre du sarcomère par les têtes de myosine, ce glissement raccourcit le sarcomère et provoque la contraction. Le glissement est possible par la succession de création et de rupture de ponts actine-myosine, ces ponts se rompant simultanément pour se rattacher au site suivant, permettant ainsi le mouvement. 6) A la fin du potentiel d'action, le réticulum sarcoplasmique re-capture le calcium cytosolique. 7) Les sites de liaison de la myosine sont bloqués par la tropomyosine, la contraction s'arrête, la fibre musculaire se relâche. Adapté d'après Pearson Education, Inc 2011 (Pearson Education, 2011).

Le couplage « excitation-contraction » se fait au niveau des triades. Le récepteur de la dihydropyridine (DHPR), canal calcique situé au niveau des tubules-T, est activé par le potentiel d'action. Il interagit alors avec le récepteur à la ryanodine (RyR) situé sur la membrane du réticulum sarcoplasmique, ce qui provoque le relargage dans le cytoplasme du calcium contenu dans les citernes

terminales du réticulum sarcoplasmique. Le calcium intracellulaire se combine à la troponine, le complexe troponine-tropomyosine change de conformation et libère les sites de liaison de la myosine sur l'actine. Les têtes de myosine peuvent ainsi s'y fixer et se déplacent le long des filaments d'actine, entraînant le rapprochement des disques Z (Figure 2). Ce phénomène de raccourcissement du sarcomère se produit simultanément dans tous les sarcomères de la cellule et résulte en une contraction musculaire. Lors du mouvement, le nombre d'unités motrices activées est lié à l'intensité de la contraction musculaire. Tant qu'il y a propagation des potentiels d'action, les canaux de libération restent ouverts. Lorsque le potentiel d'action s'arrête, les canaux se referment et les pompes calciques ATPase sarcoplasme/endoplasme (SERCA) renvoient efficacement le calcium dans le réticulum (Figure 5).

1.B.3. Le cycle cardiaque

Le muscle cardiaque est un muscle en fonctionnement continu qui se contracte de façon rythmique et automatique, de façon indépendante vis-à-vis du système nerveux volontaire. Le myocarde possède un système électrique autonome, le tissu nodal. L'automatisme cardiaque est sous la dépendance d'une innervation intrinsèque qui le rend spontanément excitable et est soutenu par une innervation extrinsèque qui module le rythme cardiaque. Son activité continue nécessite beaucoup d'énergie, il consomme 10 % de tout l'oxygène fourni à l'organisme. Chez l'Homme, la fréquence cardiaque est en moyenne de 70 battements par minute au repos, avec un débit de 4 à 5 litres de sang par minute.

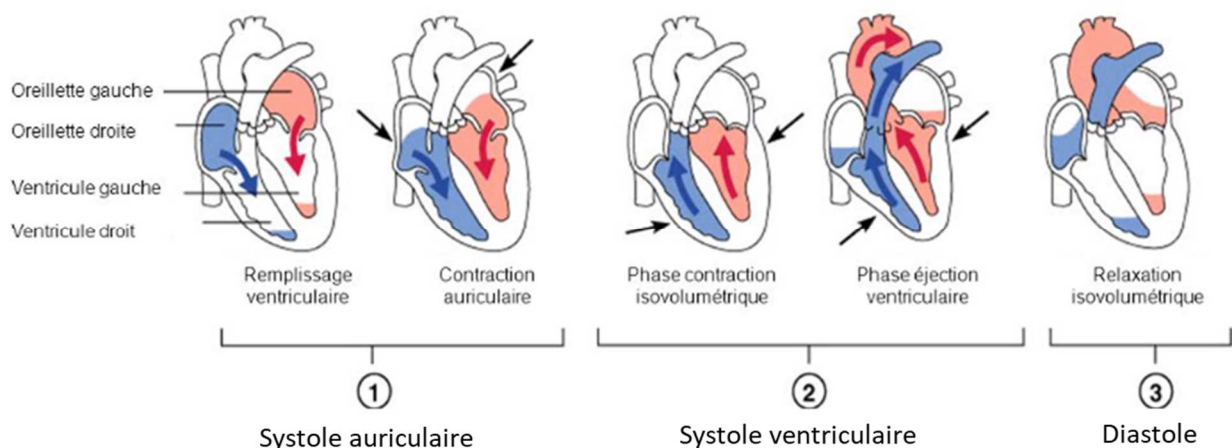


Figure 6 : Les étapes du cycle cardiaque.

Adapté d'après McKinley 2014 (McKinley et al., 2014).

Le cœur droit et le cœur gauche fonctionnent comme deux pompes synchronisées. Les oreillettes permettent la réception du sang tandis que les ventricules éjectent le sang vers les artères. Les valves permettent la circulation du sang en sens unique. Le cycle cardiaque se divise en trois

Introduction

étapes : 1) La systole auriculaire : les oreillettes se contractent pour éjecter le sang vers les ventricules. 2) La systole ventriculaire : les ventricules se contractent pour éjecter le sang vers la circulation lorsque la pression à l'intérieur des ventricules est supérieure à la pression artérielle. 3) La diastole : le cœur se relaxe et les ventricules se remplissent passivement (Figure 6). L'oreillette droite récupère le sang veineux pauvre en oxygène et riche en dioxyde de carbone par l'intermédiaire des veines caves inférieure et supérieure. Le sang passe ensuite dans le ventricule droit avant d'être propulsé vers les poumons où il va s'oxygéner. Il retourne ensuite dans le cœur par l'oreillette gauche puis le ventricule pour être ensuite distribué par l'aorte dans tout l'organisme.

1.B.4. Le tissu nodal et le système cardionecteur

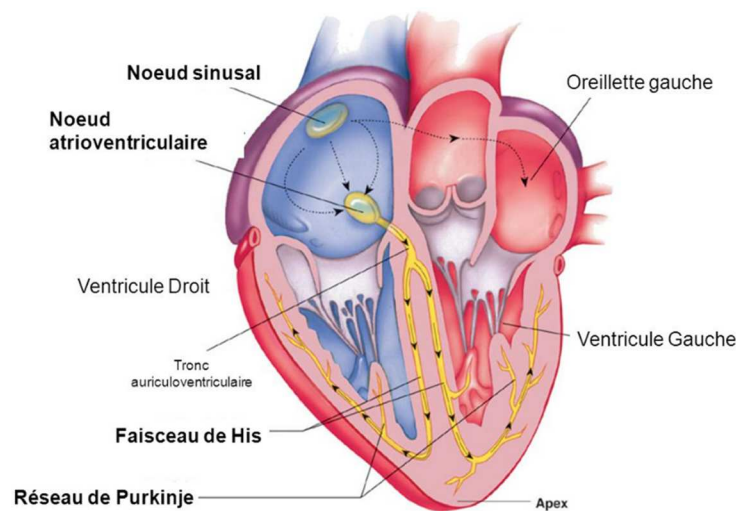


Figure 7 : Le système cardionecteur.

Adapté d'après McKinley 2014 (McKinley et al., 2014).

Le tissu nodal est composé des cellules cardionectrices regroupées au sein de nœuds dans la paroi de l'atrium droit et du faisceau de His situé dans le septum interventriculaire (Figure 7). Le battement cardiaque est initié par la dépolarisation du nœud sinusal, inversion spontanée de la polarité électrique de la membrane par passage actif d'ions à travers celle-ci. Le potentiel d'action est transmis de cellule en cellule dans les deux oreillettes induisant leur contraction, ainsi qu'au nœud atrio-ventriculaire *via* les faisceaux internodaux. Le nœud atrio-ventriculaire régule la fréquence à 70 battements par minute et retarde la conduction du signal jusqu'à l'éjection du sang des oreillettes vers les ventricules. Le potentiel d'action est ensuite transmis au faisceau de His et à ses deux branches. La terminaison des branches du faisceau de His au niveau de l'apex du cœur constitue le réseau de Purkinje qui se distribue ensuite dans tout le myocarde auquel il transmet l'influx. L'excitation se propage jusqu'à l'ensemble des ventricules. La réponse contractile dure environ 1,5 fois la durée du potentiel d'action. Les fibres sont soumises à une période réfractaire pendant laquelle elles ne peuvent pas être de nouveau excitée, ce qui permet d'éviter que le signal se propage de façon rétrograde.

II. Les cardiomyopathies dilatées dans les myopathies d'origine génétique

Un certain nombre de maladies génétiques vont toucher le muscle squelettique ou cardiaque et conduire à une myopathie ou une cardiomyopathie. De façon intéressante et en raison de la proximité fonctionnelle et structurelle de ces 2 tissus, des mutations dans un même gène peuvent conduire à des manifestations cliniques cardiaques et musculaires. Les atteintes cardiaques peuvent se présenter sous la forme d'une hypertrophie cardiaque, d'une cardiomyopathie restrictive, d'une arythmie, ou dans le cas le plus fréquent d'une cardiomyopathie dilatée (DCM). Dans cette thèse, je me suis intéressée à deux cas particuliers présentant des DCM, celui de la titine et de la dystrophine (Figure 8). Le gène de la titine, protéine majeure des sarcomères et dont les mutations peuvent conduire à différentes présentations cliniques, a été montré comme étant impliqué dans 25 % des DCM d'origine génétique. Le gène de la dystrophine quant à lui est responsable de la myopathie de Duchenne, une dystrophie musculaire progressive liée à l'X et pour laquelle la quasi-totalité des patients présente un phénotype cardiaque sous forme de DCM à l'âge de 20 ans.

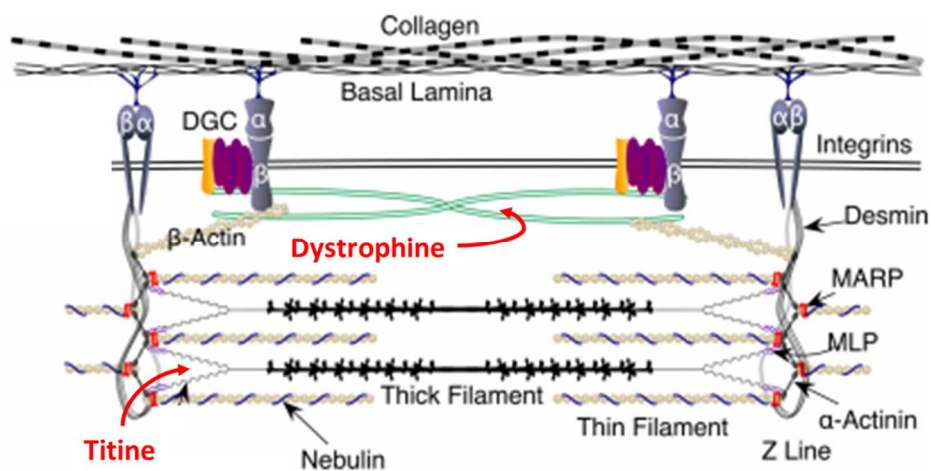


Figure 8 : Représentation des principales protéines du cytosquelette, localisation de la titine et de la dystrophine.

Adapté d'après Hughes 2015 (Hughes et al., 2015).

II.A. La cardiomyopathie dilatée

Les cardiomyopathies dilatées sont caractérisées par définition par une hypokinésie du myocarde et une dilatation des cavités cardiaques (Figure 9). Le remodelage cardiaque qui a lieu lors de la DCM se présente sous la forme d'une atteinte des cardiomyocytes associée à la présence de fibrose, indissociables l'un de l'autre : l'altération des cardiomyocytes entraîne l'expansion de la

fibrose qui remplace les cardiomyocytes nécrosés et la prolifération des fibroblastes empêche l'hypertrophie compensatrice des cardiomyocytes. Ces manifestations vont se traduire cliniquement par une diminution de la fonction cardiaque.

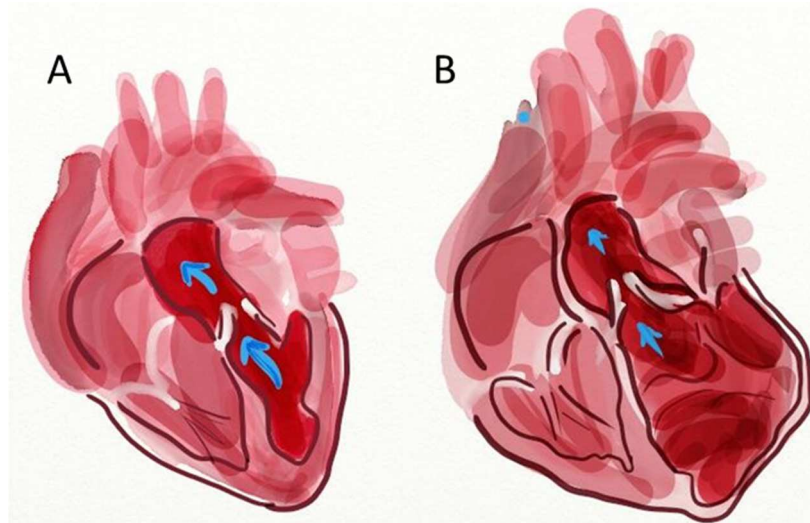


Figure 9 : La cardiomyopathie dilatée.

A) Représentation schématique d'un cœur sain. B) Représentation schématique d'un cœur atteint de cardiomyopathie dilatée. © Eleonora Adami, Max Delbruck Center for Molecular Medicine (Adami, 2017).

II.A.1. L'atteinte des cardiomyocytes

Le mécanisme exact à l'origine de l'atteinte des cardiomyocytes dépend de l'étiologie de la pathologie. Dans les DCM d'origine génétique, la plupart des gènes en cause codent pour des éléments structuraux des cardiomyocytes (Tableau 1) (Burke et al., 2016b; Schild, 2019). Les principales atteintes des cardiomyocytes dans les DCM sont une diminution de leur capacité contractile et une modification de leur structure qui vont conduire à leur apoptose et à l'hypertrophie des cardiomyocytes restant.

L'atteinte dans les cardiomyocytes s'accompagne de l'induction de gènes normalement exprimés au cours de l'embryogenèse. Les cardiomyocytes vont en particulier re-sécréter les facteurs natriurétiques atrial et cérébral (ANP et BNP) qui vont induire une diurèse et une vasodilatation afin de diminuer le volume et la pression sanguine et donc le stress du myocarde. Le type de myosine exprimé dans le cœur est également modifié. Au stade embryonnaire, la chaîne lourde de la myosine possède principalement deux isoformes co-exprimés dans tout le cœur : la β -MyHC ventriculaire lente (MYH7) et l' α -MyHC atriale rapide (MYH6). A l'âge adulte, les isoformes se répartissent plus spécifiquement dans les ventricules et les oreillettes. Lors d'une atteinte cardiaque, l'isoforme β est surexprimée et l'isoforme α sous exprimée dans tout le cœur qui voit ainsi sa contractilité diminuer. En effet, l'isoforme α a 150 à 300 % de fois la vélocité contractile et 60 à 70 % de capacité de liaison à

l'actine comparé à l'isoforme β . L'isoforme β a également une activité ATPase plus faible (Herron and McDonald, 2002; Krenz and Robbins, 2004; Nakao et al., 1997).

Tableau 1 : Protéines responsables de cardiomyopathies dilatées.

Protéine	Localisation	Impact
<i>Laminine, fukutine</i>	matrice extracellulaire, appareil de Golgi	adhésion cellulaire voies de signalisation
<i>desmocolline, plakoglobine</i>	desmosome	jonctions intercellulaires
<i>RyR2, SERCA2α, phospholamban</i>	réticulum sarcoplasmique	homéostasie calcique
<i>lamine A/C</i>	enveloppe nucléaire	organisation structurelle du myocarde
<i>dystrophine, téléthonine, α-actinine, desmine, sarcoglycanes</i>	cytosquelette	intégrité du cytosquelette transmission de la force musculaire
<i>titine, troponine, myosine, actine</i>	sarcomère	génération et transmission de la force musculaire

L'atteinte des cardiomyocytes s'accompagne également d'une perturbation des messagers secondaires impliqués dans le métabolisme et l'homéostasie calcique. Dans un cœur sain, la concentration d'ATP est constante malgré une demande importante et variable selon l'activité physique. Les réserves d'ATP sont faibles et les cellules cardiaques en synthétisent en permanence, principalement par la voie de l'oxydation des acides gras dans les mitochondries. En cas de demande importante en ATP, les voies de la glycolyse, de la glycogénolyse et surtout de la phosphotransférase sont activées. La phosphocréatine est la principale source d'ATP dans cette dernière voie, *via* l'action de la créatine kinase. Dans la DCM, le métabolisme énergétique cardiaque est altéré ainsi que le ratio ATP/phosphocréatine du fait d'une diminution de l'activité de la créatine kinase. La quantité d'ATP diminue progressivement, et par conséquent la force contractile du cœur (Ingwall, 2009; Ingwall and Weiss, 2004; Neglia et al., 2007; Neubauer et al., 1997). Les mitochondries sont secondairement atteintes dans les DCM, impactant également la respiration cellulaire et la production d'ATP, et donc participant à la perturbation du métabolisme énergétique (Gill et al., 2002; Harvey and Leinwand, 2011; Merlo et al., 2014). L'homéostasie calcique est également perturbée : le cycle intracellulaire du Ca^{2+} est ralenti et la concentration en Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique est diminuée. La force produite au cours de l'excitation, et donc la contractilité du cœur, sont diminuées (Frey et al., 2000; Serosé, 2007).

La déstabilisation de la structure des cardiomyocytes entraîne une augmentation de l'étirement lors des contractions et induit une apoptose dans un nombre croissant de cellules.

L'apoptose est induite par l'activation de plusieurs cascades de signalisation. L'une des principales voies est la voie Akt, le principal effecteur de la phosphoinositide 3 kinase (PI3K) (Xia et al., 2016). La capacité de régénération du cœur étant très faible, le principal mécanisme compensatoire initialement mis en place est une hypertrophie des cardiomyocytes résidants. Les cellules compensent ainsi de façon transitoire la surcharge pour augmenter la fonction cardiaque et diminuer la tension sur le mur ventriculaire (Heineke and Molkentin, 2006). Cette hypertrophie des cardiomyocytes implique une activation chronique de la voie Akt ainsi que la participation de la voie de signalisation de la protéine G activée par le relargage de différents facteurs en conditions pathologique tels que les facteurs adrénérgiques, l'angiotensine II et l'endothéline (Harvey and Leinwand, 2011). Secondairement, la mort cellulaire des cardiomyocytes va conduire à une réaction inflammatoire et fibrotique.

II.A.2. La fibrose cardiaque

Faisant suite à la dégénérescence du tissu et à l'inflammation persistante, la réaction fibrotique se traduit par une prolifération de myofibroblastes, le type cellulaire caractéristique de la fibrose qui n'est présent dans le cœur qu'en cas d'atteinte cardiaque, et par une participation du système immunitaire. La fibrose cardiaque va s'installer en réponse à divers signaux chimiques ou mécaniques, à la fois en remplacement des cardiomyocytes détruits (fibrose de remplacement) et en réaction aux perturbations mécaniques pour apporter un soutien au tissu cardiaque (fibrose interstitielle). Ces évènements vont conduire à une accumulation excessive des composants de la matrice extracellulaire (MEC), et donc avoir un impact sur la structure et la fonction cardiaque. La fibrose est un processus essentiel à la réparation des tissus endommagés mais son accumulation est pathologique, sa persistance favorise la transition vers l'insuffisance cardiaque.

II.A.2.a. Les effecteurs de la fibrose cardiaque

La mort des cardiomyocytes va entraîner une réaction inflammatoire de par la libération des molécules de danger. Les cellules immunitaires résidentes vont alors être activées et des cellules circulantes recrutées. Les macrophages, les mastocytes et les lymphocytes entraînent une production constante de molécules pro-fibrotiques (Shinde and Frangogiannis, 2017). Cette réaction inflammatoire va aussi entraîner l'activation des fibroblastes. Lors de la mise en place du processus fibrotique, les différentes cellules impliquées (fibroblastes, cardiomyocytes, cellules immunitaires) produisent des facteurs pro-fibrotiques, principalement des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs de croissance pro-fibrotiques. Les cytokines induisent le relargage de protéases qui contribuent à la dégradation de la MEC. Il a été montré que les produits de dégradation de la MEC

Introduction

peuvent amplifier la réponse immunitaire. Ces voies de signalisation sont en lien les unes avec les autres, et peuvent s'activer ou se réguler mutuellement.

Parmi les cytokines pro-inflammatoires, le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et les interleukines 1 β (IL-1 β) et 6 (IL-6) sont les principales cytokines retrouvées dans la fibrose cardiaque. La voie de signalisation du facteur de croissance transformant β (TGF- β) est une des principales voies entraînant l'apparition de la fibrose, par l'activation des fibroblastes en myofibroblastes, l'induction de l'hypertrophie des cardiomyocytes, l'augmentation des intégrines, l'accélération du dépôt de la MEC et l'inhibition de la dégradation de cette dernière en inhibant les MMP et en augmentant les TIMP (Kong et al., 2018) (Schiller et al., 2004). TGF- β 1 est fortement activé lors du remodelage cardiaque et de la fibrose (Frangogiannis, 2017). La voie de signalisation TGF- β active la transcription de plusieurs molécules impliquées dans la fibrose par sa voie de signalisation canonique par les protéines Smad2/3/4 (Kong et al., 2018) ou par des voies alternatives comme JNK, p38, MAPK et ERK (Molkentin et al., 2017).

Les facteurs de croissance pro-fibrotiques sont majoritairement le facteur TGF- β et le facteur de croissance du tissu connectif (CTGF ou CCN2) qui amplifie les effets de la voie TGF- β .

Plusieurs voies de signalisation et facteurs de transcription sont activés par la liaison des molécules pro-fibrotiques à leurs récepteurs, déclenchant l'activation des fibroblastes en myofibroblastes. L'activation du système Rénine-Angiotensine stimule la prolifération des fibroblastes et la synthèse de la MEC par l'activation du récepteur à l'angiotensine type 1 et le relargage local d'angiotensine II ou par le biais de l'aldostérone (Ju et al., 1997). La rénine et l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) sont produites par les cardiomyocytes, les macrophages et les fibroblastes (Weber et al., 2013b). L'angiotensine II induit l'activation de Smad et de p38. L'aldostérone, *via* l'activation de son récepteur minéralocorticoïde est également un déterminant majeur du développement de la fibrose dans le myocarde (Lijnen and Petrov, 2000). Le système β -adrénergique active également les fibroblastes cardiaques, induit la synthèse de facteurs de croissance par les cardiomyocytes et régule l'expression des cytokines par les macrophages (Molkentin et al., 2017; Noh et al., 2017; Nuamnaichati et al., 2018). Le stress oxydatif joue lui aussi un rôle, il régule le phénotype des fibroblastes en lien avec TGF- β , l'aldostérone et l'angiotensine II (Grosche et al., 2018). Les espèces réactives de l'oxygène générées dans les fibroblastes régulent la MEC par l'action de MMP et de TIMP.

La voie de signalisation Wnt contrôle la prolifération, la différenciation et la migration des cellules. La sécrétion des protéines de la famille Wnt est ciblée par les facteurs de croissance tels que TGF- β (Blyszczuk et al., 2017). Plusieurs publications ont mis en lumière le rôle crucial de la voie Wnt dans le développement de la fibrose cardiaque. In vitro il a été montré que des membres de la famille

Wnt active les fibroblastes cardiaques pour les convertir en myofibroblastes et promouvoir la synthèse de cytokines (Abraityte et al., 2017b) (Carthy et al., 2011). L'activation des fibroblastes par la β -caténine, l'effecteur de la voie Wnt, module la fibrose et l'hypertrophie des cardiomyocytes (Xiang et al., 2017).

Les ARN non codants, les micros ARN (miRNA) et les longs ARNs non codants (lncRNA) ont également un rôle prépondérant dans la fibrose cardiaque (Creemers and van Rooij, 2016). Les miRNA agissent en ciblant différentes cascades de signalisation fibrogéniques (Piccoli et al., 2016). Un certain nombre de miRNAs ont été impliqués dans la régulation négative de la fibrose cardiaque.

II.A.2.b. Les myofibroblastes

Les myofibroblastes sont des cellules présentant à la fois les caractéristiques des fibroblastes et des cellules musculaires lisses. Elles dérivent principalement des fibroblastes résidants, mais peuvent également provenir de la différenciation de cellules endothéliales, de cellules de l'épicaarde ou de progéniteurs hématopoïétiques (Kanisicak et al., 2016). Sous l'influence de facteurs mécaniques et/ou chimiques, les fibroblastes prolifèrent, migrent vers la zone lésée ou subissant des tensions importantes et se différencient en proto-myofibroblastes puis en myofibroblastes (Figure 10) (Tomasek et al., 2002). Ils expriment des protéines qui ne sont habituellement pas exprimées dans les fibroblastes quiescents, comme l'actine alpha du muscle lisse (α SMA), la chaîne lourde de la myosine du muscle lisse, la vinculine, la paxilline et la tensine. En phase précoce, les proto-myofibroblastes n'expriment pas encore l' α SMA mais sont reconnaissables car ils expriment des fibres de stress à l'origine du déplacement du fibroblaste, riches en actine cytoplasmique et organisées en faisceaux parallèles (Hinz, 2007). Les myofibroblastes sont plus mobiles et plus contractiles que les fibroblastes, avec une plus grande capacité de synthèse de la MEC. Comme les fibroblastes, les myofibroblastes ne sont pas des cellules excitables. Ils font donc une barrière à la conduction du potentiel d'action.

Les myofibroblastes régulent la production de facteurs pro-fibrotiques et des cytokines. Ils secrètent notamment des MMPs et des TIMPs pour réguler l'homéostasie de la MEC. Ils continuent de sécréter des facteurs pro-fibrotiques en plus grande quantité, comme des chimiokines (IL- α , IL- β , IL6, IL10, TNF), des cytokines (IL-8), des facteurs de croissance (TGF- β , GM-CSF...) et des médiateurs de l'inflammation (monoxyde de carbone, peroxyde d'hydrogène, azote, phospholipase A2 activée).

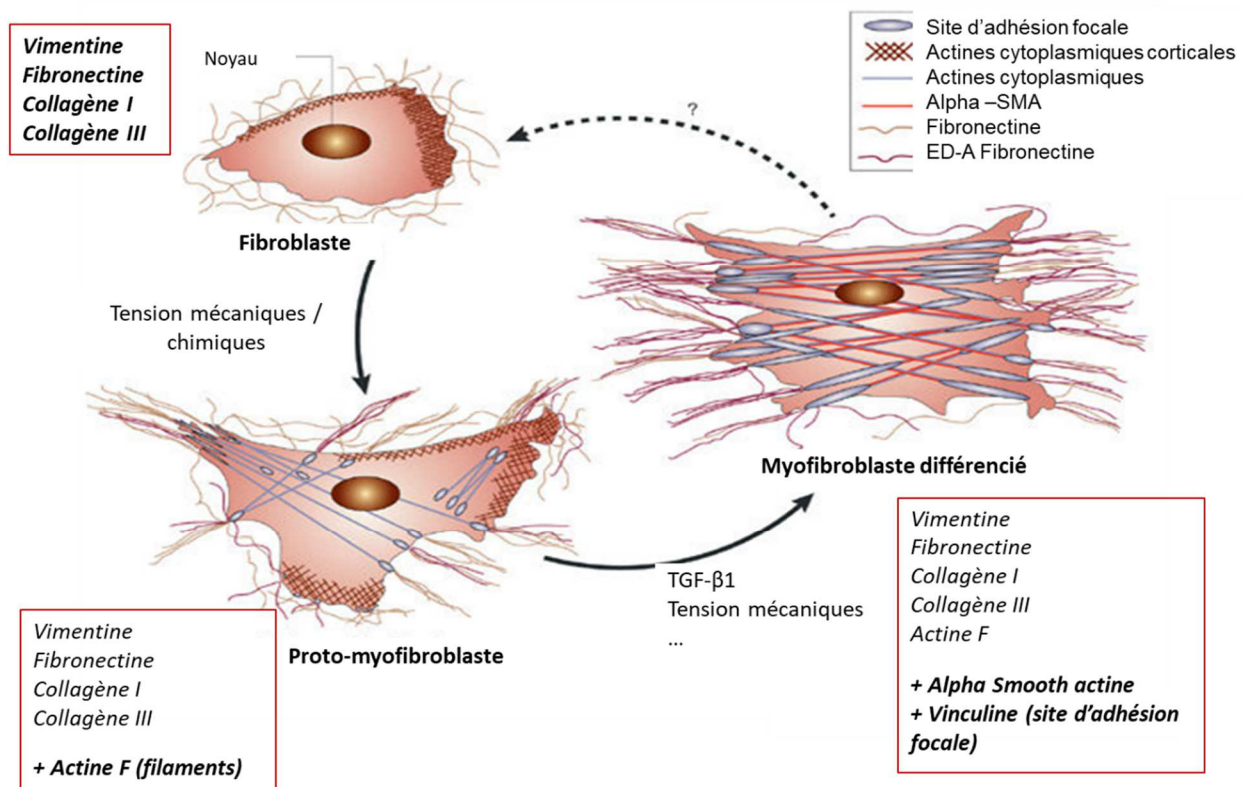


Figure 10 : La différenciation du fibroblaste en myofibroblaste.

Adapté d'après Tomasek 2002 (Tomasek et al., 2002).

II.A.2.c. Le tissu fibrotique

En parallèle de sa fonction de remplacement des cardiomyocytes par la fibrose qui se développe sur le site de la perte des cardiomyocytes afin d'empêcher la rupture du tissu, le tissu fibrotique est également mis en place dans le cœur en réaction à la tension sur les parois cardiaques afin d'en augmenter la rigidité par une fibrose interstitielle, réactive, qui se retrouve dans les espaces entre les cardiomyocytes (Figure 11). La fibrose dans les cœurs DCM est répartie de façon assez homogène dans tout le myocarde. Le schéma de la distribution de la fibrose semble correspondre à la distribution des tensions intracardiaques.

La MEC est une structure dynamique qui fournit un support mécanique mais aussi joue un rôle majeur dans la communication entre cellules. Dans le myocarde normal, il existe une régulation dynamique de la MEC où les dépôts de collagène par les fibroblastes sont compensés par une dégradation par les metalloprotéases (MMP). Dans le tissu fibrotique, cette balance est perturbée à la fois quantitativement mais aussi vraisemblablement qualitativement. En raison de la difficulté d'analyse, peu de données existent sur ces modifications dans les DCM d'origine génétiques. Il a été rapporté que le collagène de type III est le premier à augmenter dans la phase précoce de la DCM, puis

le collagène de type I (Bishop et al., 1990; Okada et al., 1996). Dans la DCM installée, le ratio collagène I / collagène III est fortement augmenté (Pauschinger et al., 1999) (Wei et al., 1999). Le collagène I étant porteur d'une plus grande rigidité, son augmentation pourrait également contribuer à la dysfonction diastolique (Kapelko, 2001). L'augmentation du collagène interstitiel est associée à un ventricule plus rigide et résulte en une dysfonction contractile lors de la systole. Les interactions entre les cardiomyocytes et une MEC intacte sont requises pour préserver la fonction contractile (Wang et al., 2006) (Ivey and Tallquist, 2016; Souders et al., 2009) (Frangogiannis, 2019) (Ma et al., 2018).

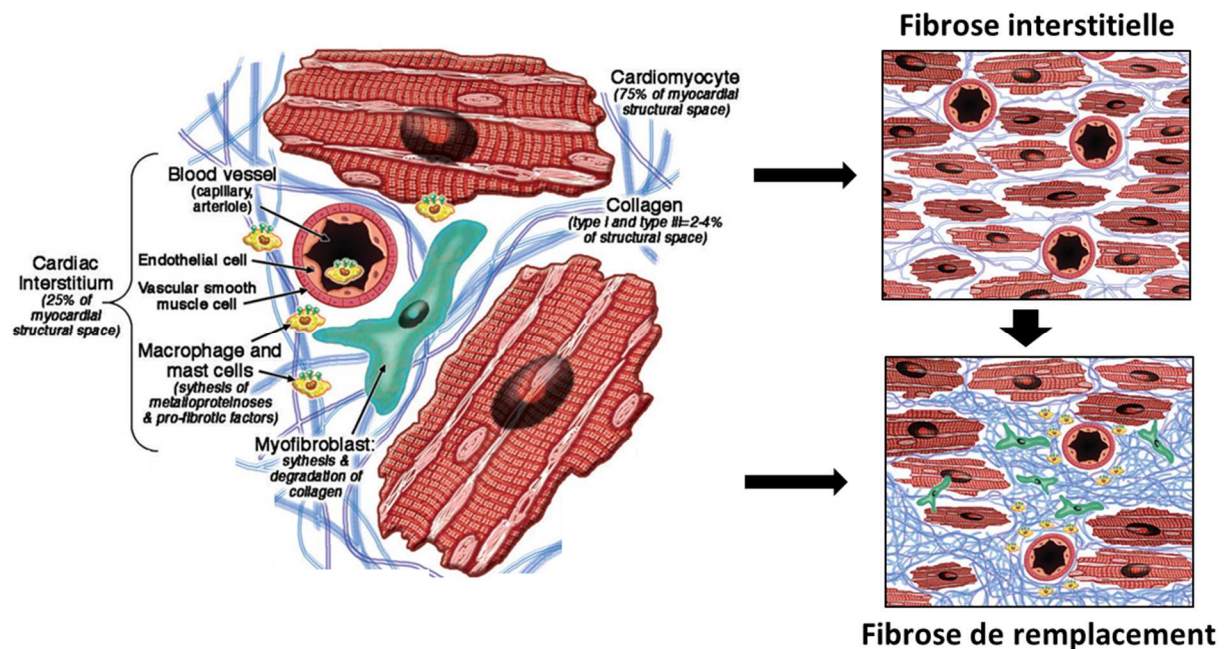


Figure 11 : La fibrose.

Adapté d'après Mewton 2011 (Mewton et al., 2011).

En plus des modifications mécaniques, la présence de la fibrose peut diminuer l'accès des cardiomyocytes aux nutriments par la perturbation de la perfusion des cardiomyocytes due à la fibrose périvasculaire. De même, les travées de collagènes ralentissent la conduction du potentiel d'action, dérangeant le couplage excitation-contraction des cellules du myocarde.

II.A.3. Les conséquences cliniques

Dans les DCM, la dilatation cardiaque touche en particulier le ventricule gauche et est associée à un amincissement de l'épaisseur des parois du cœur. Le cœur est hypertrophié et prend une forme plus sphérique. Dans la phase asymptomatique de la pathologie, la dilatation ventriculaire permet l'augmentation des volumes sanguins éjectés, compensant la diminution de la contractilité du cœur et permettant ainsi de conserver un débit cardiaque normal. Les premiers symptômes évocateurs d'une DCM se présentent sous la forme d'une dyspnée d'effort, d'une asthénie et de palpitations qui peuvent

être accompagnés d'une douleur thoracique. La DCM évolue progressivement vers une insuffisance cardiaque lorsque le débit cardiaque chute. A terme, le risque de mortalité est élevé, avec 40 à 50 % de morts subites (Japp et al., 2016). Les DCM constituent actuellement la principale cause d'insuffisance cardiaque et de transplantation cardiaque (Burke et al., 2016a).

Afin de poser le diagnostic d'une DCM, le principal outil utilisé est l'échographie. Les critères diagnostiques sont une fraction d'éjection inférieure à 50 % et un diamètre télédiastolique du ventricule gauche supérieur à 117 %. Le volume d'éjection systolique est défini par la différence entre le volume du cœur à son maximum, en fin de diastole, et à son minimum, en fin de systole. La fraction d'éjection est définie par le rapport de ce volume d'éjection sur le volume en fin de diastole (Cardiogen, 2018).

La DCM touche plus fréquemment les hommes que les femmes, entre 20 et 60 ans. Sa prévalence est d'un cas sur 2 500 personnes dans la population générale. Parmi les facteurs identifiés comme étant responsables des DCM, les facteurs génétiques sont responsables de 30 à 50 % des cas. Plus de 40 gènes ont été identifiés comme responsables de DCM lorsqu'ils subissent des mutations, le plus fréquemment il s'agit de mutations sur le gène de la titine, de la dystrophine, de la myosine 7 ou encore de la laminine (Tayal et al., 2017).

II.B. La titine

II.B.1. Structure et fonction de la titine

La titine (TTN), ou connectine, doit son nom à Titan du fait de sa grande taille. En effet, il s'agit de la plus grande protéine connue dans le monde vivant. Le gène *TTN* d'une taille de 294 kb est situé sur le chromosome 2 chez l'Homme, dans le locus 2q31. Le gène a été entièrement séquencé en 2001 (Bang et al., 2001). Il est composé de 363 exons codants pour 35 000 acides aminés. La forme canonique la plus longue de la titine a une masse moléculaire de 3 816 030 kDa. Cette protéine géante s'étend sur un demi-sarcomère et mesure plus d'un μm de long. C'est la troisième protéine la plus abondante après la myosine et l'actine dans le muscle strié. Elle représente 10 % de la masse myofibrillaire et 4 % du poids total d'un adulte. La titine est présente dès le développement de l'embryon et de façon assez précoce, particulièrement dans le cœur où elle est retrouvée dès la troisième semaine (Fougerousse et al., 1998). La titine a un rôle majeur dans la stabilité et l'organisation du sarcomère. Elle participe à l'assemblage de ce dernier durant le développement des cellules musculaires. Durant la contraction musculaire, la titine assure un rôle de support mécanique, de transmetteur de force et de maintien de l'architecture myofibrillaire. Par ces nombreuses

interactions protéiques, elle représente également un carrefour de voies de signalisation (Granzier and Labeit, 2004).

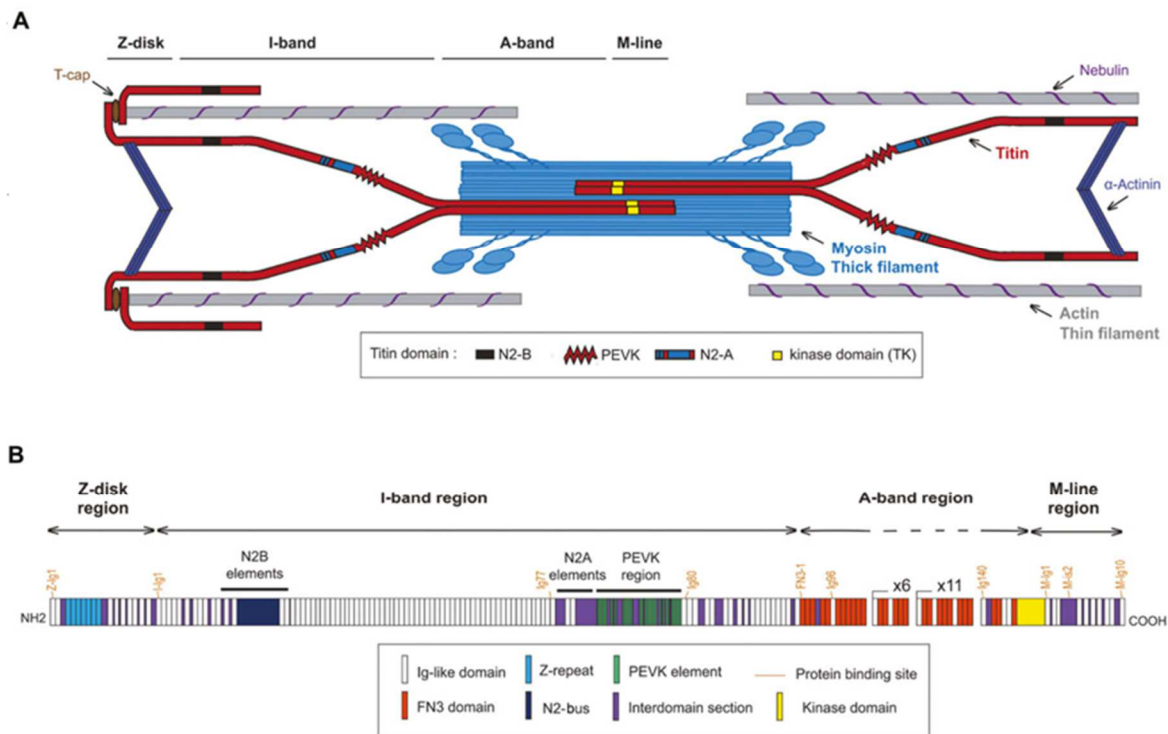


Figure 12 : La titine.

A) Situation de la titine au sein du sarcomère. B) Les différentes régions de la titine. Adapté d'après Chauveau 2014 (Chauveau et al., 2014).

La titine est constituée de quatre régions structurales et fonctionnelles qui correspondent au disque Z, à la bande I, à la bande A et à la bande M (Figure 12). Elle est composée à 90 % de répétitions de domaines immunoglobuline et fibronectine III.

- La partie amino-terminale de la titine se trouve au niveau du disque Z du sarcomère où deux molécules de titine appartenant à deux sarcomères adjacents se chevauchent. Cette partie est principalement composée de sept domaines immunoglobuline et quatre à sept répétitions appelés Zr, spécifiques à la partie Z de la titine. Cette partie se lie à l'ankyrine (Kontogianni-Konstantopoulos and Bloch, 2003), l'alpha-actinine (Young et al., 1998), la téléthonine (Gregorio et al., 1998), la nébuline et la filamine-C (Labeit et al., 2006). La région amino-terminale de la titine agit comme senseur de l'étirement mécanique des fibres cardiaques (Knoll et al., 2002). La région du disque Z permet l'assemblage, la stabilisation et le maintien des myofibrilles (Kontogianni-Konstantopoulos et al., 2009).
- Au niveau de la bande I du sarcomère, la titine est constituée de 90 domaines immunoglobuline, d'une région N2 qui est présente sous la forme N2A dans le muscle et N2B ou N2BA dans le cœur et d'un domaine PEVK (proline-acide glutamique-valine-lysine).

Introduction

Les partenaires connus de la titine à la bande I sont l'actine, la tropomyosine (Raynaud et al., 2004), la nébuline, l' α B-crystalline (Bullard et al., 2004), FHL1 et 2 (Lange et al., 2002), les calpaïnes 1 et 3 (Huebsch et al., 2005; Raynaud et al., 2005), la myopalladine et certaines protéines de la famille des MARPs (muscle ankyrin repeat protein) (Bang et al., 2001). La bande I permet l'élasticité de la titine en se dépliant lors de l'étirement du muscle ce qui va générer une tension passive. Ce ressort moléculaire est le principal déterminant de l'élasticité du myocarde (Fukuda et al., 2008). Le ratio N2BA/N2B détermine la tension passive et le degré de rigidité de la titine.

- Dans la région de la bande A du sarcomère, la titine est constituée de structure répétitives de fibronectine III et d'immunoglobulines et d'un domaine kinase à son extrémité. Ses partenaires sont la myosine, la Myosin Binding Protein C (MyBP-C) (Labeit et al., 1992) et les protéines de la famille Muscle specific Ring Finger protein (MURF) (Centner et al., 2001). Dans sa bande A, la titine permet principalement l'intégration et la stabilisation des filaments de myosine dans le sarcomère (Trinick, 1994). Contrairement aux autres régions de la titine, la bande A est très peu sujette à l'épissage alternatif.
- Enfin, la partie carboxy-terminale de la titine, présente dans la bande M du sarcomère, contient un domaine sérine/thréonine kinase (TK), des répétitions d'immunoglobulines (M1 à M10) et des séquences uniques (séquence d'insertion is1 à is7). Cette partie est codée par 6 exons, appelés Mex (exon de la ligne M). Les partenaires de la bande M de la titine sont multiples. La calmoduline, une enzyme calcium dépendante, et Nbr1/p62, des protéines en doigt de zinc, interagissent avec le domaine TK (Amodeo et al., 2001; Lange et al., 2005). La protéine M, la myoméline 1 et FHL2 se lient à différents domaines au niveau du centre de cette région (Lange et al., 2002; van der Ven and Furst, 1997). La séquence is7 est un site de liaison pour la calpaïne 3. L'obscurine et son homologue l'obscurine like 1 (obsl1), ainsi que la myosprine et l' α -synemine se fixent en M10 (Evila et al., 2017; Fukuzawa et al., 2008; Prudner et al., 2014) (Figure 13). Dans la région carboxy-terminale, deux molécules de titine se chevauchent et servent d'ancrage pour les filaments épais de myosine et les autres composants de la ligne M. L'alignement du domaine M4 avec les myomésines stabilise le sarcomère lors de la contraction. Le domaine tyrosine kinase a une activité catalytique en phosphorylant la myosine. La titine en M10 interagit avec l'obscurine qui, elle-même, est liée au réticulum sarcoplasmique (Lange et al., 2009).

Introduction

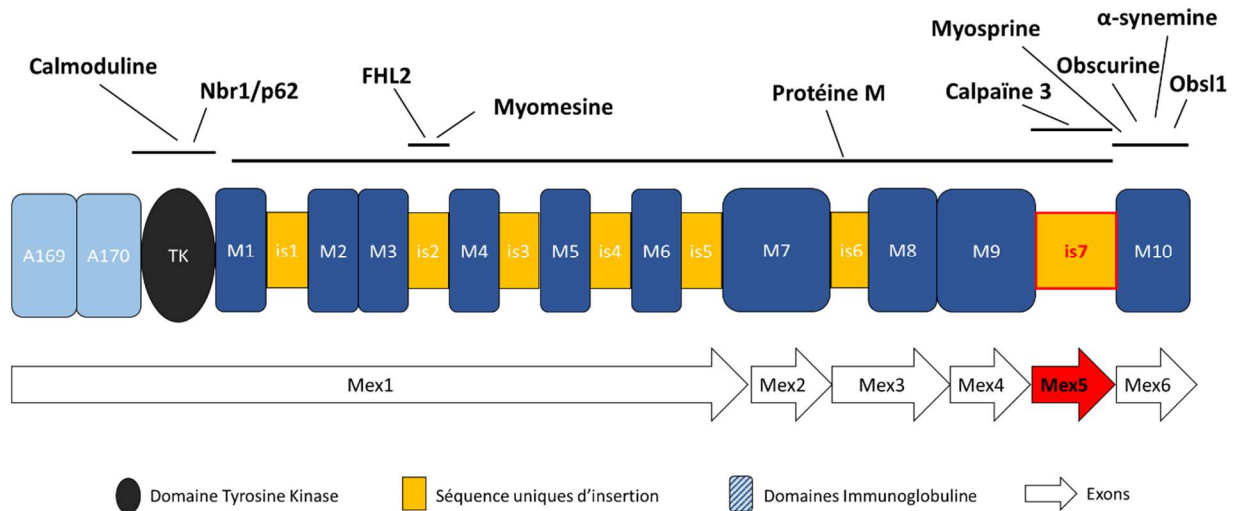


Figure 13 : La ligne M de la titine.

Organisation de la titine le long de la ligne M : exons Mex et domaines correspondants. Protéines interagissant avec les différents domaines de la ligne M.

La titine est retrouvée sous plusieurs isoformes différentes du fait de l'épissage alternatif des exons. Au niveau cardiaque, la titine existe principalement sous les isoformes N2BA, isoforme longue comprenant les domaines N2A et N2B de la bande I, et N2B, isoforme courte comprenant uniquement le domaine N2B (Gerull, 2015). Ces isoformes sont co-exprimées dans les sarcomères. Les isoformes tronquées Novex-1, 2 et 3 épissées respectivement au niveaux des exons 45, 46 et 48 sont également retrouvées dans le cœur pour Novex-1 et dans les muscles cardiaque et squelettiques pour Novex-2 et 3. Novex-3 est constitué du disque Z et de la bande I (Kellermayer et al., 2019; Trombitás et al., 2001). Un nouvel isoforme, l'isoforme Cronos, constitué uniquement des bandes A et M a plus récemment été décrit (Zou et al., 2015) (Figure 14).

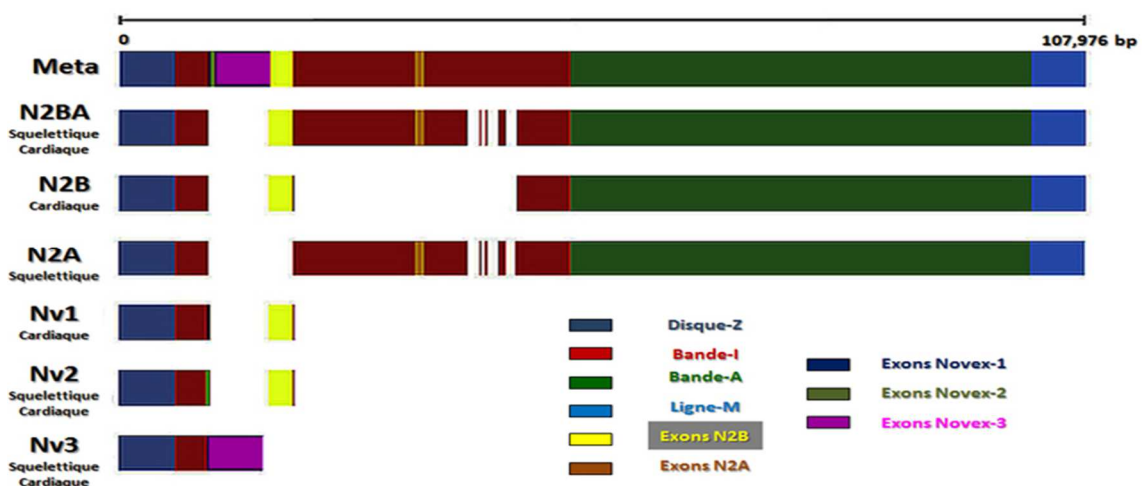


Figure 14 : Principales isoformes de la titine.

D'après Gerull 2015 (Gerull, 2015).

II.B.2. Les titinopathies et les DCM associées

Le gène de la titine *TTN* étant très grand, il est sujet à de nombreux variants génétiques qui peuvent être délétères ou non. Environ 1 % de la population générale est porteuse d'une variation tronquante hétérozygote sur le gène *TTN* sans qu'il existe de conséquences avérées (Schafer et al., 2017). Lorsqu'elles sont pathologiques, les variations sur le gène de la titine vont être responsables de dystrophies musculaires et/ou de cardiomyopathies, ces maladies sont appelées les titinopathies. Les titinopathies ont donc un phénotype et un pronostic très variables en fonction de la nature et de la position des mutations. Elles peuvent être dominantes ou récessives.

Les titinopathies présentant un phénotype musculaire exclusivement décrites à ce jour sont la dystrophie musculaire tibiale (TMD), la dystrophie des ceintures de type 2J (LGMD2J) (Udd et al., 2005) et la myopathie centronucléaire congénitale autosomique dominante (Ceyhan-Birsoy et al., 2013). Les titinopathies présentant un phénotype musculaire couplé à un phénotype cardiaque, sont la myopathie héréditaire avec déficience respiratoire précoce (Izumi et al., 2013), la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (Harris et al., 2017), les titinopathies congénitales (Oates et al., 2018) et la myopathie de Salih dans laquelle la cardiomyopathie est rapidement fatale (Hackman et al., 2012). Le plus fréquemment cependant, les mutations dans le gène de la titine sont responsables de cardiomyopathies isolées, sans atteinte musculaire. Dans la plus part des cas, il s'agit d'une cardiomyopathie dilatée (Herman et al., 2012; LeWinter and Granzier, 2013; Tayal et al., 2017), bien que les variations sur le gène de la titine puissent être également responsables de cardiomyopathies restrictives (RCM) (Peled et al., 2014), de cardiomyopathies arythmogènes du ventricule droit (ARCV) (Taylor et al., 2011), de fibrillation atriale (Choi et al., 2018) ou de cardiomyopathies hypertrophiques (HCM) (Elliott et al., 2008; Satoh et al., 1999; Savarese et al., 2016) (Figure 15).

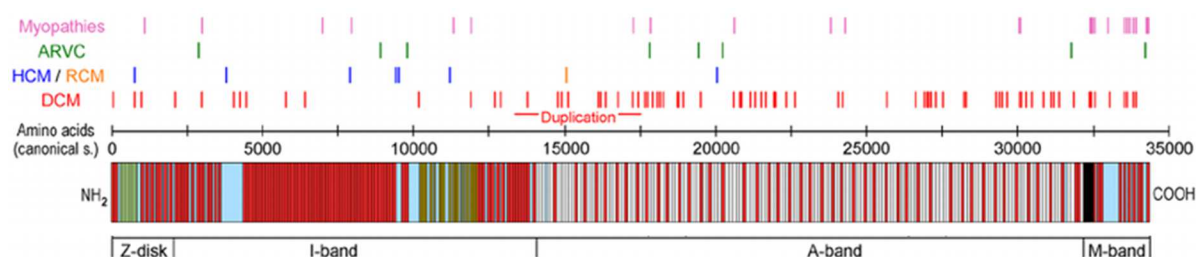


Figure 15 : Localisation sur le gène de la titine des mutations responsables de titinopathies chez l'Homme.

Adapté d'après Linke 2014 (Linke and Hamdani, 2014).

La majorité des mutations de la titine responsable de DCM se trouve dans la bande A (Roberts et al., 2015; Stöhr et al., 2018) (Figure 15). Chez l'individu sain porteur de mutations elles se situent préférentiellement dans la bande I où elles sont potentiellement épissées du fait de promoteurs

alternatifs, résultant à des conséquences minimales ou pas de conséquence fonctionnelles (Deo, 2016). Une augmentation du ratio des isoformes N2BA/N2B peut être présente dans le DCM, diminuant la rigidité de la titine (Nagueh et al., 2004). Les DCM dues à la titine sont impliquées dans 1/250 cas d'insuffisance cardiaque (Burke et al., 2016a). Dans 45 % des cas il s'agit d'une pathologie familiale (Merlo et al., 2014).

Le mécanisme moléculaire des DCM liées à la titine est peu décrit et assez variable selon l'emplacement de la variation sur le gène. Les variants de la titine produisent une protéine plus courte avec des propriétés altérées : la production et la transmission de la force sont diminuées. La liaison de la titine à ses partenaires est impactée. Une étude chez des patients présentant des variations à différents endroits sur le gène de la titine induisant une DCM a montré l'altération de plusieurs voies de signalisation, notamment le métabolisme énergétique cardiaque et la fonction mitochondriale (augmentation des gènes de la chaîne de transport des électrons) associés à un stress oxydatif et à de la fibrose interstitielle (Verdonschot et al., 2018).

II.B.3. Les modèles animaux : le modèle murin DeltaMex5

Seuls deux modèles de mutations d'occurrence naturelle dans la titine ont été rapportés. Il s'agit de la souris *mdm* (dystrophie musculaire avec myosite) qui porte une délétion homozygote dans la région N2A et qui présente un phénotype dystrophique touchant le muscle squelettique uniquement (Garvey et al., 2002) et un Doberman, présentant un variant homozygote au niveau de la titine sur la forme N2B et qui présente un phénotype cardiaque (Meurs et al., 2019).

Il existe également des modèles générés en laboratoire, comme un modèle poisson zèbre avec une délétion dans la bande A de la titine et qui conduit à une DCM (Huttner Inken et al., 2018). La délétion complète du gène de la titine est létale au niveau embryonnaire chez la souris (Radke et al., 2019). Plusieurs modèles murins présentant des délétions le long du gène *TTN* et présentant un phénotype cardiaque sous forme de DCM ont été développés : délétion homozygote de la région PEVK (Granzier et al., 2009), de la région N2B (Radke et al., 2007), de N2BA (Nusayr et al., 2018), dans la bande A (Tonino et al., 2017), de la ligne M (Charton et al., 2016; Gotthardt et al., 2003; Radke et al., 2019). Un modèle mimant la mutation c.43628insAT, dans la bande A, responsable d'une DCM chez l'Homme a été développé : les souris homozygotes ne survivent pas au stade embryonnaire, tandis que les souris hétérozygotes ont un phénotype cardiaque de DCM uniquement lorsqu'elles sont soumises à un stress (Gramlich et al., 2009).

Un de ces modèles, une souris délétée de l'exon Mex5, a été généré dans le laboratoire et m'a servi dans cette thèse comme modèle de DCM (Charton et al., 2016). L'exon Mex5 est l'avant dernier

exon du gène *TTN*, situé au niveau de la bande M du sarcomère. Il s'agit du seul exon de la bande M à être soumis à un épissage alternatif. Les isoformes de la titine présents dans le cœur et le soléaire chez l'Homme et la souris sont presque exclusivement des isoformes Mex5+ (Figure 16) (Charton et al., 2016). L'exon Mex5 code pour le domaine is7, situé entre deux domaines immunoglobuline (Figure 13). Le domaine is7 porte un site de liaison à la calpaine 3, protéine impliquée dans une dystrophie musculaire mais naturellement peu présente dans le cœur (Kinbara et al., 1997). La délétion de l'exon Mex5 n'est pas létale au niveau embryonnaire. Les premières caractérisations du modèle ont été effectuées principalement sur le muscle. Le poids des muscles reste inchangé. Le muscle soléaire montre un phénotype dystrophique particulièrement important, avec la présence de centronucléation et de fibrose. Malgré les atteintes histologiques, la force et les paramètres contractiles restent normaux (Charton et al., 2016). De façon intéressante, une première analyse histologique du modèle a révélé une forte présence de tissus fibrotique dans le cœur. L'atteinte cardiaque du modèle DeltaMex5 a été caractérisée pendant la thèse.

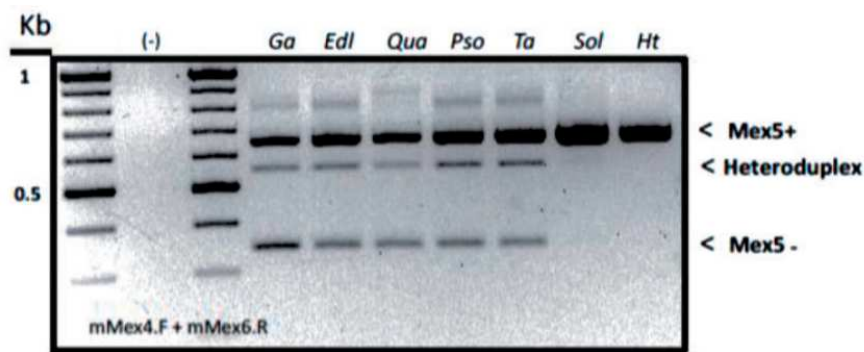


Figure 16 : RT-PCR montrant l'expression des isoformes de la titine Mex5+ et Mex5- selon les muscles. Le muscle soléaire (Sol) et le cœur (Ht) n'ont pas d'isoforme Mex5-, tandis que les autres muscles possèdent les deux formes de titine (Charton et al., 2016).

II.C. La dystrophine

II.C.1. Structure et fonction

Le gène *DMD* codant pour la dystrophine a été identifié en 1986. Il se trouve sur le chromosome X chez l'Homme, plus précisément, au niveau du locus Xp21 (Koenig et al., 1987; Monaco et al., 1986). Ce gène est le plus long gène humain avec une taille de 2 500 kb pour 79 exons. La dystrophine présente différentes isoformes du fait d'épissage alternatif, de la présence de différents promoteurs et de sites alternatifs de poly-adénylation. La forme musculaire complète est une protéine de 427 kDa composée de 3685 acides aminés et est composée de quatre domaines : le domaine amino-terminal (acides aminés (AA) 14 à 240), le domaine central composé de 24 séquences répétitives de type spectrine (numérotées de R1 à R24) organisées en triple hélice α entrecoupées de 4 régions

Introduction

flexibles (Hinge H1 à H4) (AA 253-3040), le domaine riche en cystéine (AA 308-3360, dont 15 cystéines) et le domaine carboxy-terminal (AA 3361-3685) (Figure 17 et Figure 18). En plus du promoteur musculaire, il existe deux autres promoteurs différents permettant l'expression d'une forme longue spécifiquement dans le cerveau et les cellules de Purkinje du cervelet qui diffèrent de la forme musculaire de par leur premier exon. Il existe également des formes plus courtes de la dystrophine de 260, 140, 116, 71 et 40 kDa, dues à la présence de promoteurs alternatifs. Ces formes réduites sont retrouvées majoritairement au niveau de la rétine et du cerveau (Doorenweerd et al., 2017; Muntoni et al., 2003).

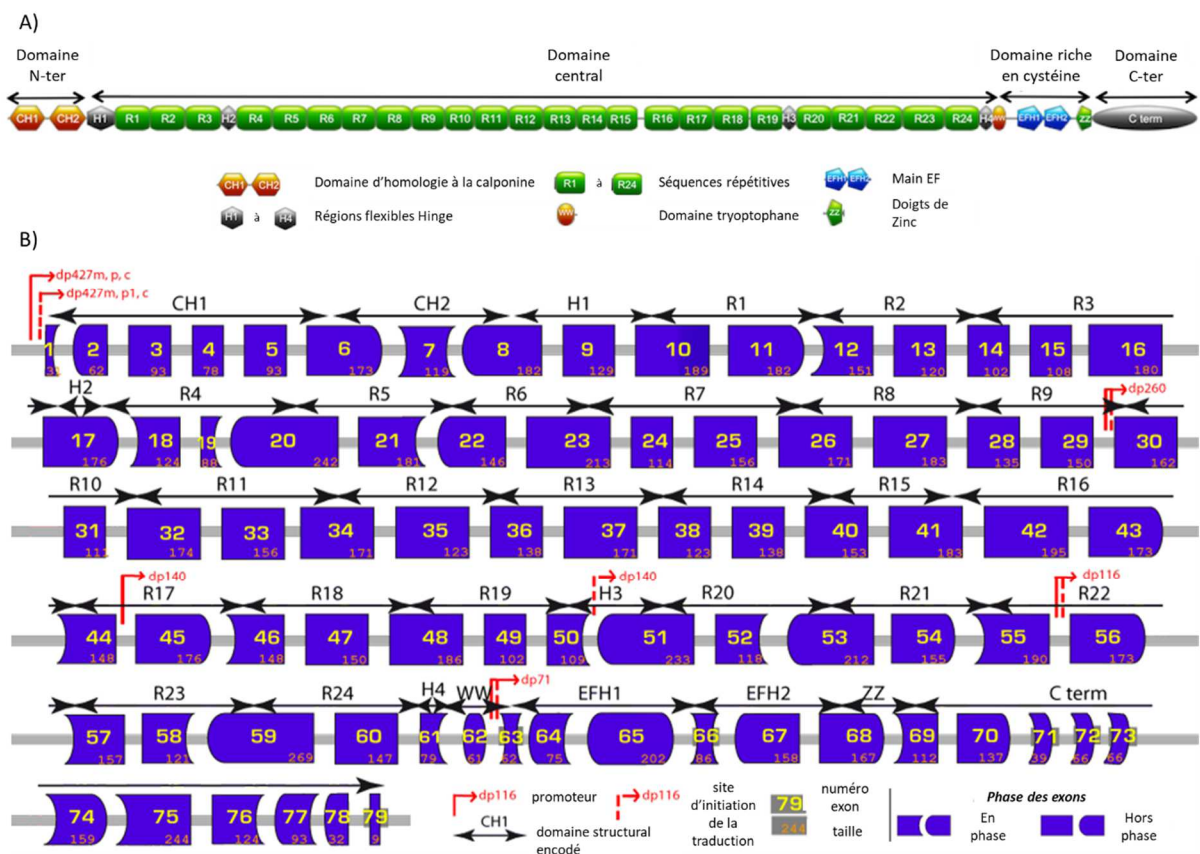


Figure 17 : Structure du gène de la dystrophine.

A) Domains de la forme longue de la dystrophine musculaire. B) Organisation des exons sur le gène. En bleu : les exons. En rouge : les différents promoteurs. Adapté d'après © eDystrophin.

La dystrophine est retrouvée au niveau de la face cytoplasmique du sarcolemme. Elle représente 5 % des protéines du sarcolemme et 0,002 % des protéines des cellules du muscle strié squelettique (Watkins et al., 1988). La dystrophine appartient à un complexe protéique, dénommé le complexe protéique associé à la dystrophine (DAPC), composé de protéines situées dans le cytoplasme, au niveau du sarcolemme et d'une protéine dans la matrice extracellulaire. Dans le cœur, il a été rapporté qu'en plus d'être présent au niveau des costamères à la membrane plasmique comme dans le muscle squelettique, le complexe DAPC est retrouvé dans les invaginations de T-tubules des

Introduction

cardiomyocytes (Kaprielian et al., 2000; Klietsch et al., 1993). Le domaine amino-terminal de la dystrophine se fixe sur les filaments d'actine-F assurant ainsi la liaison au cytosquelette intracellulaire. Les zones répétitives du domaine central de la dystrophine ont une affinité pour les lipides et donc permettent une interaction avec la membrane plasmique. Elles participent également à la stabilité de la liaison à l'actine. Les zones répétitives R16 et R17 lient l'oxyde nitrique synthase neuronale (nNOS), oxydoréductase produisant l'oxyde nitrique, ou monoxyde d'azote, qui va jouer un rôle notamment dans la vasodilatation locale essentielle pour l'oxygénation des muscles (Stamler and Meissner, 2001). Les répétitions R20 à R23 ont une forte affinité pour les microtubules du cytosquelette (Belanto et al., 2014). Ensuite, le domaine riche en cystéine de la dystrophine se lie à la β -dystroglycane intramembranaire. Cette dernière interagit avec les sarcoglycanes α , β , γ et δ , l' α -dystroglycane et indirectement avec les sarcospanes et la laminine-2, assurant la liaison entre le sarcolemme et la matrice extracellulaire. A son extrémité carboxy-terminale, la dystrophine se fixe aux syntrophines α , β 1 et β 2 et à l' α -dystrobrevine (Figure 18). A la membrane, les syntrophines interagissent avec des canaux sodiques qui jouent un rôle de signalisation entre la fibre musculaire et son environnement (Ehmsen et al., 2002; McGreevy et al., 2015). L'organisation du complexe entre les deux types de muscle diffère au niveau des interactions protéiques. L'association du Cter de la dystrophine se fait dans le cœur avec la β -2-syntrophine et l' α -3-dystrobrevine et non pas avec l' α -1-syntrophine et la β -1-syntrophine comme dans le muscle squelettique, ceci en raison de l'abondance différentielle de ces protéines dans le tissu correspondant. Il existe également des interactions spécifiques du cœur, telles que celle avec la cavine-1, ahnak1, cypher et la chaîne B de l'alpha-crystalline (Johnson et al., 2012). Dans le cœur, nNOS est principalement retrouvé au niveau du réticulum sarcoplasmique et en moindre quantité à la membrane du sarcolemme contrairement au muscle squelettique dans lequel le nNOS est majoritairement retrouvé dans le sarcolemme (Carnicer et al., 2017; Xu et al., 1999).

De par ses interactions avec les autres composants du DAPC, la dystrophine est indispensable au maintien de l'architecture et à l'intégrité des fibres musculaires. L'un des rôles principaux du DAPC est en effet de stabiliser le sarcolemme et de protéger les fibres musculaires contre les forces mécaniques dues aux contractions et étirements musculaires, en assurant la liaison entre le cytosquelette intracellulaire et la matrice extracellulaire. (Davies and Nowak, 2006). Il possède également un rôle dans la signalisation cellulaire, entre autre dans la voie MAPK (protéine kinase activée par la mitogenèse) *via* la β -dystroglycane et dans la maturation de la jonction neuromusculaire *via* les syntrophines (Constantin, 2014). La dystrophine est également importante pour le fonctionnement du canal potassique du système cardio-protecteur des cardiomyocytes (Bhat et al., 2018).

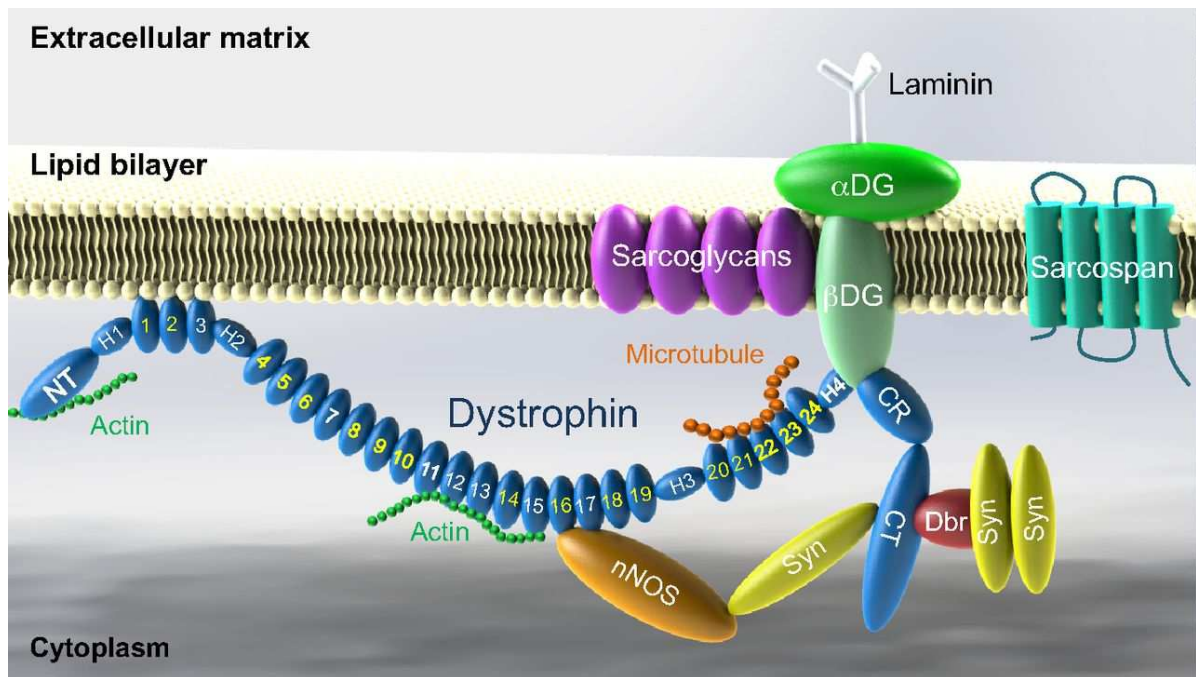


Figure 18 : La dystrophine et le DAPC.

Domaine amino-terminal (NT), domaine riche en cystéine (CR), domaine carboxy-terminal (CT), α -dystroglycane (α DG), β -dystroglycane (β DG), synthase neuronale de l'oxyde nitrique (nNOS), syntrophines (Syn), dystrobrevine (Dbr) (McGreevy et al., 2015).

II.C.2. Les dystrophinopathies

Des mutations dans le gène de la dystrophine sont à l'origine de la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD). Il s'agit d'une maladie génétique rare touchant 1 garçon sur 5000 à la naissance. C'est la plus fréquente des dystrophies musculaires, un ensemble de maladies rares d'origine génétique qui touchent le muscle et qui sont caractérisées par une diminution progressive de la masse musculaire accompagnée d'une faiblesse musculaire. (Emery, 1991). En France, 2500 personnes environ sont affectées par la maladie. Le médecin français Guillaume Duchenne de Boulogne est le premier en 1868, à identifier cliniquement cette myopathie à laquelle il donnera son nom. En 1955, un médecin allemand, Peter Emil Becker, décrit une forme de la pathologie moins sévère, la Dystrophie Musculaire de Becker (BMD). L'occurrence de la BMD est plus faible, la pathologie touche environ 5 garçon sur 100 000 à la naissance. Il existe également une forme de la pathologie d'occurrence très rare affectant uniquement le muscle cardiaque : la cardiomyopathie liée à l'X (XLDCM) (Nakamura, 2015).

II.C.2.a. Description clinique

Les signes cliniques de la DMD sont nombreux et sévères. Chez les patients BMD, il est observé une grande hétérogénéité du phénotype (van den Bergen et al., 2014). Les premiers signes cliniques

Introduction

de la DMD apparaissent vers l'âge de 3 ans avec des troubles de la marche dus à une faiblesse musculaire progressive des membres inférieurs. Cette faiblesse se généralise ensuite aux membres supérieurs. La perte de la locomotion survient vers 10 ans en moyenne, accompagnée d'une atteinte du diaphragme. Les muscles du tube digestifs sont également atteints. A l'adolescence, il est également observé l'apparition d'une scoliose. Ces symptômes sont associés à une fragilité des os progressive due au manque de sollicitation mécanique, ce qui favorise l'ostéoporose. Des problèmes nutritionnels dus au manque d'activité physique et à la prise de corticoïdes mènent fréquemment à une situation de surpoids dans un premier temps, puis des difficultés de déglutition entraînent une dénutrition (Le Rumeur, 2015). En plus des manifestations musculaires, la maladie de Duchenne peut s'accompagner de problèmes cognitifs ou comportementaux : 30% des patients ont un QI < 70, 32 % présentent une hyperactivité, 27 % de l'anxiété et 15 % des patients présentent des troubles autistiques (Cotton et al., 2001; Hendriksen and Vles, 2008). Le décès est le plus souvent dû à une atteinte cardiorespiratoire et l'espérance de vie des patients est de moins de 30 ans. L'amélioration de la prise en charge des complications respiratoires, notamment grâce à la mise sous ventilation artificielle, a augmenté l'espérance de vie, de ce fait l'incidence de l'atteinte cardiaque sur la mortalité chez les patients a augmenté.

L'anomalie cardiaque la plus fréquente dans la DMD est une cardiomyopathie dilatée qui se révèle cliniquement vers l'âge de 15 ans et qui touche quasiment tous les patients après l'âge de 20 ans. Dans le cas de la BMD, l'atteinte cardiaque se développe à l'âge de 20 ans, puis 70 % des patients sont concernés après 35 ans. Chez ces patients, la sévérité de l'atteinte cardiaque n'est pas liée à la sévérité de l'atteinte musculaire. Des anomalies électrophysiologiques (tachycardie sinusale, intervalle PQ court, allongement du QT, arythmies, augmentation du rythme cardiaque) ainsi qu'une dysfonction systolique (hyperexcitabilité ventriculaire, dysfonction ventriculaire gauche, diminution de la fraction de raccourcissement) sont observées (Gao and McNally, 2015). La fréquence de ces anomalies augmente avec l'âge et avec l'apparition d'une hypertrophie cardiaque. Dans les phases finales de la maladie, la dysfonction systolique peut se compliquer par des arrêts cardiaques et une mort subite. L'atteinte cardiaque est responsable de 40 % des décès chez les patients DMD et de plus de la majorité de la mortalité chez les patients BMD (Nastase et al., 2017; Stromberg et al., 2012; Wittlieb-Weber et al., 2019). La XLDCM est une pathologie où est présente uniquement une atteinte du myocarde débutant à l'adolescence par une cardiomyopathie dilatée à progression très rapide qui engendre la mort seulement 1 à 2 ans après le diagnostic (Finsterer and Stöllberger, 2003).

II.C.2.b. Etiologie

Du fait de sa grande taille, le gène de la dystrophine est sujet à de nombreuses mutations qui peuvent engendrer des dystrophinopathies. Dans un tiers des cas, la mutation responsable de la maladie est une néomutation. S'agissant d'une mutation récessive sur le chromosome X, seuls les garçons sont atteints sauf quelques très rares cas. Dans 60-70 % des cas de DMD, la mutation est une délétion d'un ou de plusieurs exons, dans 26 % des cas il s'agit d'une mutation ponctuelle et dans 10 à 15 % des cas d'une duplication d'une partie du gène (Tuffery-Giraud et al., 2009). Dans le cas de la DMD, les mutations engendrent un décalage du cadre de lecture menant à un codon stop prématuré tandis que, dans le cas des BMD, le cadre de lecture est conservé. Il existe certaines zones de mutations plus fréquentes : entre les exons 45 et 55 ou entre les exons 3 et 19. L'emplacement de la mutation sur le gène *DMD* affecte le phénotype musculaire mais également le phénotype cardiaque. En revanche, la taille de la délétion n'impacte pas le phénotype. Le phénotype musculaire et cardiaque sera moins sévère si les domaines répétés de type spectrine de la dystrophine restent en phase entre eux, en effet une mutation où les domaines ne sont plus en phase entraîne un changement de direction de la partie carboxy-terminale de la dystrophine et donc un changement structurel plus important. La présence des domaines amino-terminal et riche en cystéine semblent mener à un phénotype moins sévère, tandis que la présence du domaine C-ter semble moins indispensable (Gao and McNally, 2015; Tandon et al., 2015). Les délétions dans la région amino-terminale de la dystrophine sont liées à une apparition plus précoce du phénotype cardiaque, tandis que les mutations dans la partie centrale sont liées à des cardiopathies plus tardives dans la BMD (Kaspar et al., 2009; Magri et al., 2011). La XLDCM est principalement liée à une mutation dans la région amino-terminale de la dystrophine.

Il a été observé des cardiomyopathies chez 10 à 60 % des femmes porteuses d'une mutation sur le gène *DMD* (Finsterer and Stöllberger, 2003). La DMD est caractérisée par une absence quasi totale de la dystrophine dans le muscle, tandis que les patients souffrant de BMD présentent une réduction de la quantité de protéine ou une protéine de taille anormale. La relation entre la quantité de dystrophine exprimée chez les patients BMD et la sévérité des symptômes n'est vraie qu'en dessous d'un niveau de 10 % de dystrophine, au-dessus la sévérité semble plus liée au type de mutation (Kaspar et al., 2009).

II.C.2.c. Pathophysiologie

L'absence de la dystrophine engendre une rupture du sarcolemme due à une perturbation des protéines associées ancrées à la membrane ainsi qu'un dérèglement de la signalisation cellulaire qui mènent à une mort cellulaire et une dégénérescence progressive des muscles. Le muscle est plus

susceptible d'être lésé suite à une contraction musculaire et subit des cycles de dégénération et de régénération continus (Figure 19).

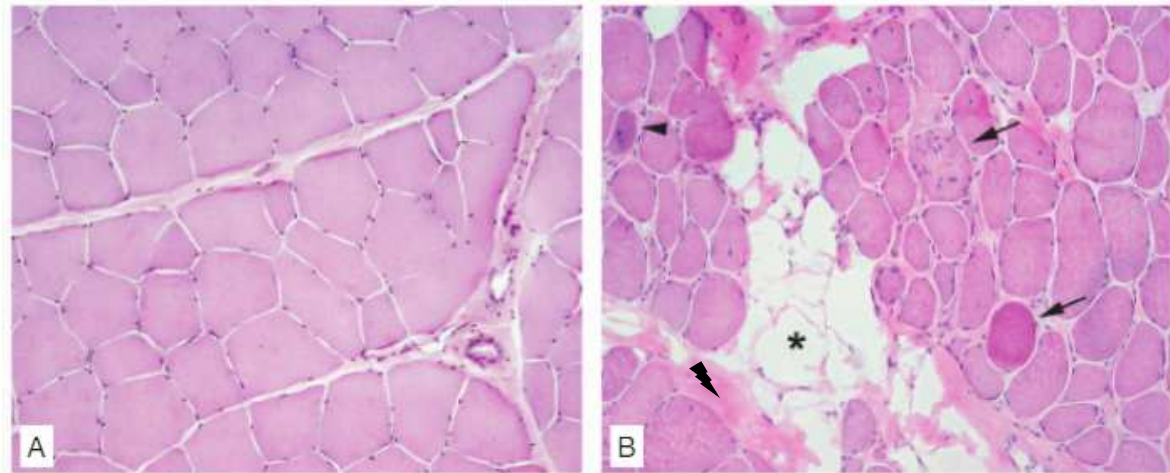


Figure 19 : Dégénération du muscle strié squelettique dans la DMD.

A) Histologie d'un muscle sain en coloration Hématoxyline Phloxine Safran (HPS). B) Muscle atteint de DMD. Flèches : nécrose des myofibres. Triangle : régénération. Astérisque : infiltration graisseuse. Eclair : tissu fibrotique. La taille des fibres est également réduite et présente une forme plus arrondie. Adapté d'après Skuk 2004 (Skuk, 2004).

Dans le cœur, la perte de la dystrophine entraîne une instabilité de la membrane. Le sarcolemme devient plus fragile et perméable laissant des protéines de grande taille comme la créatine kinase et la troponine T traverser la membrane cellulaire (Ergul et al., 2012). Le stress oxydatif a un rôle important dans le développement et la progression de la dystrophie cardiaque. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont surexprimées par la NADPH oxydase 2 (Jung et al., 2008). Dans un même temps, la signalisation NO et la nitrosylation sont modifiées et contribuent à la signalisation calcique anormale et à la dégradation de la fonction des cardiomyocytes (Bia et al., 1999; Rando, 2001). L'homéostasie calcique est également altérée par l'augmentation de la perméabilité membranaire qui laisse passer passivement les ions et par une dérégulation des canaux ioniques. La concentration de calcium intracellulaire est augmentée (Vallejo-Illarramendi et al., 2014; Williams and Allen, 2007). Les canaux RyR semblent être particulièrement impactés, ils subissent une hyperphosphorylation, une oxydation et une nitrosylation excessive (Bellinger et al., 2009). En phase avancée de la pathologie, l'hypersensibilité de RyR associée à l'influx de Ca^{2+} dans le sarcolemme résulte en une fuite du calcium du réticulum sarcoplasmique accompagnée par une surcharge du cytosol et de la mitochondrie en calcium. La fonction mitochondriale est dérégulée, en partie du fait de l'augmentation du calcium dans la mitochondrie, mais également par l'augmentation des ROS dans le cytosol, et la production énergétique par les mitochondries est diminuée tôt dans la pathologie (Kang et al., 2018). L'élévation du calcium intracellulaire est responsable d'une altération de la contractilité des cardiomyocytes, mais également de la stimulation de la protéolyse, notamment par les calpaïnes (Letavernier et al., 2012) et

de l'activation des voies de signalisation de mort cellulaire (Shin et al., 2013). La fuite du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique contribue à la diminution de la force produite par les cardiomyocytes restant (Meyers and Townsend, 2019; Shirokova and Niggli, 2013). La mort des cardiomyocytes entraîne l'apparition progressive d'un tissu fibrotique qui touche préférentiellement les murs postérobasal et latéral du ventricule gauche et atteint 59 % des tissus cardiaques après 15 ans (Finsterer and Stöllberger, 2003).

Parmi les mécanismes mis en place dans le muscle afin d'essayer de compenser la perte de la dystrophine, il existe une protéine présentant de fortes similarités avec la dystrophine : l'utrophine. Elle est physiologiquement exprimée dans le muscle au cours du développement fœtal, puis après la naissance son expression se restreint aux jonctions neuromusculaires et myotendineuses. Dans le muscle dystrophique, l'utrophine est retrouvée au niveau de fibres en régénération où elle prend la place de la dystrophine et stabilise les membres du DAPC tels que les sarcoglycanes et les dystroglycanes. Cependant, elle ne possède pas toutes les propriétés de la dystrophine, notamment l'utrophine ne lie pas le domaine nNOS (Janghra et al., 2016). Dans le muscle strié squelettique, il est également observé une régulation positive des isoformes non musculaires de la dystrophine qui compensent en partie la perte de l'isoforme musculaire, cependant ce processus n'est pas retrouvé dans le cœur (Kamdar and Garry, 2016).

II.C.3. Les modèles animaux : le modèle murin DBA2-mdx

Il existe plusieurs animaux modèles de la myopathie de Duchenne : soit ils présentent naturellement une mutation dans le gène *DMD*, soit celle-ci a été générée en laboratoire. Les deux modèles les plus utilisés sont un modèle sur grand animal, le chien Golden Retriever (GRMD), et un modèle sur petit animal, la souris mdx mais il existe également d'autres modèles comme le rat, le chat, le cochon, *Caenorhabditis elegans* ou le poisson zèbre. Plusieurs races de chien présentent des mutations spontanées dans le gène menant à un phénotype dystrophique. Le modèle GRMD porte une mutation sur l'intron 6 du gène *DMD* entraînant une exclusion de l'exon 7 liée à un codon stop prématuré et donc à l'absence de dystrophine. Le chien GRMD est un bon modèle de la dystrophie musculaire de Duchenne car il présente un phénotype musculaire et cardiaque proche de l'Homme, avec cependant une mortalité néonatale élevée que l'on ne retrouve pas chez l'humain (Kornegay, 2017; Kornegay et al., 1988). Le travail sur modèle canin demande cependant un budget conséquent pour l'élevage, les quantités de produits à tester sont importantes et le développement de la maladie se fait sur plusieurs années. De plus, une grande variabilité phénotypique entre les individus est observée. Les modèles murins sont les modèles *in vivo* les plus utilisés car il s'agit d'un modèle mammifère mais de petite taille, facile à élever et à manipuler génétiquement. Une forme spontanée

Introduction

de dystrophie musculaire due à une mutation ponctuelle sur l'exon 23 du gène de la dystrophine a été identifiée dans une lignée de souris C57BL/10, la souris mdx (Bulfield et al., 1984). Elle présente un phénotype musculaire, avec un taux de CK élevé dans le plasma, une atteinte histologique, des cycles de dégénération/régénération du muscle ainsi qu'une diminution de la force et de la puissance musculaire avec l'âge. La fonction respiratoire est également diminuée en corrélation avec une dégénération progressive du diaphragme. Il est observé une augmentation de la taille du ventricule droit et la présence de fibrose à 15 mois, mais pas de cardiomyopathie dilatée (Wells, 2018; Yucel et al., 2018). Si le phénotype musculaire chez la souris mdx reflète en partie ce qui se passe chez l'Homme, bien que les signes cliniques ne soient pas très sévères, il n'en est pas de même pour le phénotype cardiaque qui est très peu présent et seulement à un âge avancé. De plus la dégénérescence musculaire reste assez modérée et la durée de vie des souris n'est diminuée que de 25 % tandis qu'elle diminue de 75 % chez l'Homme. Les études cardiaques sur ce modèle sont principalement faites chez les souris mdx femelles à un âge avancé qui présentent une atteinte plus proche de celle présente chez l'humain, mais l'influence du genre sur les études pose question étant donné que ce sont les garçons qui sont touchés (Bostick et al., 2010). Des mutations sur d'autres régions du gène *DMD* ont été générées chez la souris sur différents fonds génétiques, chez des souris immuno-déficientes, ainsi que des modèles de double mutation avec d'autres protéines d'intérêt telle que l'utrophine, de modèles de souris humanisées, de raccourcissement du télomère...

La souris DBA2mdx est une souris mdx sur un fond génétique DBA2/J. Ce fond possède une mutation sur le gène *LTBP4* (latent TGF- β -binding protein 4), une protéine régulatrice de l'activité de la voie de signalisation TGF- β (Fukada et al., 2010). Il a été démontré chez l'Homme que le génotype de *LTBP4* chez les patients DMD influençait l'âge de la perte de la marche (Flanigan et al., 2013). Le phénotype de la souris DBA2mdx est plus sévère que celui de la souris mdx classique, notamment s'agissant de l'atteinte cardiaque. Chez ces souris sont observés : une perte de poids et de masse musculaire, une atteinte histologique (fibrose, remplacement graisseux, diminution de la taille des fibres, inflammation, nécrose, calcification), une augmentation du taux de CK plasmique, une atrophie musculaire accompagnée qu'une perte de la fonction squelettique (capacité de course diminuée, diminution force musculaire). L'atteinte cardiaque est présente dès 3 mois, avec une hypertrophie cardiaque et des lésions fibrotiques. A partir de 7 mois, la fonction cardiaque est diminuée : diminution de la fraction d'éjection et de la fraction de raccourcissement (Coley et al., 2016; Fukada et al., 2010; van Putten et al., 2019).

III. Les approches thérapeutiques dans les cardiomyopathies dilatées

III.A. La prise en charge actuelle des cardiomyopathies dilatées

Les médicaments actuellement disponibles pour le traitement des DCM vont permettre d'améliorer les symptômes mais pas de traiter la cause de la pathologie. Les traitements prescrits sont ceux prescrits en cas d'insuffisance cardiaque, accompagnés de mesures hygiéno-diététiques telles que la diminution de la consommation d'alcool, la réduction des apports en eau et en sels et un exercice physique modéré et régulier.

Parmi les traitements pharmaceutiques, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (IEC) empêchent la production d'angiotensine II afin de diminuer la vasoconstriction et la tension artérielle. Les médicaments diurétiques permettent d'éliminer l'excès de sels et d'eau de l'organisme en inhibant la réabsorption rénale du sodium. Les β -bloquants, ou antagonistes des récepteurs β -adrénergiques, bloquent les effets des médiateurs du système adrénergique stimulés lors de la DCM et diminuent le rythme cardiaque. Les antagonistes du récepteur minéralo-corticoïde bloquent la liaison de l'aldostérone et diminuent la tension artérielle. Lorsque les troubles du rythme sont importants, des anti-arythmiques comme l'amiodarone sont prescrits. L'implantation d'un pacemaker et/ou d'un défibrillateur automatique peut également être envisagé. Dans les cas les plus sévères, les patients peuvent bénéficier d'une transplantation cardiaque (Ponikowski et al., 2016). Ces approches sont donc également valables pour la prise en charge des DCM dans les cas des DMD et titinopathies. Il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement curatif de ces pathologies. Le traitement par corticoïdes, fréquemment prescrit dans la DMD, permet une amélioration du phénotype musculaire à moyen terme grâce à une diminution de l'inflammation mais son action sur le phénotype cardiaque est sujette à débat. La prise en charge des DCM liés à la dystrophine et la titine passe par un bilan cardiaque annuel et systématique (électrocardiogramme et échographie). Il a été montré en particulier que le Périndopril, un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, diminue la mortalité chez les patients DMD lorsqu'il est pris en traitement préventif dès l'enfance (Duboc et al., 2005).

Des molécules en test dans le traitement de l'atteinte cardiaque dans la DMD sont principalement des molécules déjà utilisées dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. L'analyse d'une étude de clinique de phase III sur l'utilisation de l'Eplérénone et la Spironolactone, des diurétiques anti-aldostérones, est en cours (essai NCT02354352). L'action du Nebivolol, un

bêtabloquant, est en cours d'évaluation (essai phase III NCT01648634). Le Riméporide, un inhibiteur sélectif du transporteur sodium/proton NHE-1, développée pour le traitement des insuffisances cardiaques chroniques permet de réduire l'accumulation anormale de calcium et de sodium dans les fibres musculaires et les cellules cardiaques en régulant leur taux dans les cellules. Les premiers résultats d'un essai de phase Ib dans la DMD démontrent une amélioration des biomarqueurs (essai NCT02710591). D'autres thérapies visent le traitement de l'atteinte musculaire et de l'atteinte cardiaque par la diminution de la fibrose. C'est le cas pour le Pamrevlumab (essai phase II NCT02606136), un anticorps monoclonal dirigé contre le facteur de croissance du tissu conjonctif, et le Tamoxifène (essais phase I NCT02835079 et phase III NCT03354039), un anti-estrogène.

III.B. Les nouvelles pistes thérapeutiques

La réduction des conséquences des DCM obtenue avec les traitements actuels est primordiale, mais le défaut de contractilité du myocarde à la base de la pathologie demeure sans traitement. Les cardiomyopathies et l'insuffisance cardiaque restent malgré la prise en charge une des causes majeures de morbidité et de mortalité dans le monde. Il existe donc un besoin médical de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Parmi les différentes possibilités (approches pharmacologies, approches de thérapie cellulaire et approches de thérapie génique) ne sera présentée dans cette introduction que la thérapie génique, qui va soit cibler la cascade patho-physiologique de la DCM, soit cibler le gène responsable de la pathologie en lui-même.

Il n'y a ce jour eu aucun essai clinique impliquant un produit de thérapie génique pour le traitement spécifique des DCM. En revanche les essais précliniques et cliniques sur les insuffisances cardiaques seront abordés, l'insuffisance cardiaque étant la phase finale de la DCM, ces approches pourraient être appliquées à la pathologie (Figure 22).

III.B.1. Généralités sur la thérapie génique

La thérapie génique consiste à introduire du matériel génétique dans des cellules pour soigner une maladie. Selon la définition de l'Agence Européenne du Médicament (EMA) publiée au journal officiel de l'Union Européenne en 2009, par médicament de thérapie génique, on entend « un médicament biologique qui a les caractéristiques suivantes: a) il contient une substance active qui contient ou constitue un acide nucléique recombinant administré à des personnes en vue de réguler, de réparer, de remplacer, d'ajouter ou de supprimer une séquence génétique; b) son effet thérapeutique, prophylactique ou diagnostique dépend directement de la séquence d'acide nucléique recombinant qu'il contient ou au produit de l'expression génétique de cette séquence ».

Introduction

Selon les maladies, la thérapie génique s'effectue *ex vivo* ou *in vivo*. *Ex vivo*, les cellules sont modifiées en laboratoire avant d'être réimplantées au patient tandis que *in vivo* le vecteur est injecté directement chez le patient. La thérapie génique peut-être envisagée avec plusieurs stratégies.

- Par l'utilisation d'un vecteur permettant l'apport de matériel génétique dans les cellules. Cette approche peut être utilisée soit pour effectuer une supplémentation du gène déficient grâce à l'apport d'une copie du gène qui va induire la production d'une protéine fonctionnelle dans les cellules des patients ou pour surexprimer un gène support, soit pour réprimer un gène ayant un impact négatif grâce à l'apport par le vecteur de petits acides ribonucléiques en épingle à cheveux (shRNA) par exemple. C'est cette stratégie qui sera utilisée au cours de la thèse.

- Par édition génomique qui permet de réparer les mutations génétiques de façon ciblée, grâce notamment aux technologies CRISPR-Cas9 ou TALENs

- Par modification de l'ARN, par exemple grâce au saut d'exon. Cette technologie se base sur l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens qui s'hybrident sur le pré-ARN messager de l'exon porteur de la mutation et qui excluent cet exon lors de la maturation de l'ARN messager (ARNm). L'exon malade est sauté, ce qui permet de restaurer le cadre de lecture de l'ARNm afin de produire une protéine raccourcie mais fonctionnelle.

III.B.2. Utilisation du vecteur adéno-associé recombinant

Les principaux vecteurs de thérapie génique sont les virus (75 % des essais cliniques de thérapie génique). Ils ont la capacité de s'introduire dans les cellules et d'y apporter leur matériel génétique. Cette propriété est utilisée dans la thérapie génique par la génération de vecteurs recombinants qui conservent les propriétés infectieuses du virus sans la pathogénicité associée. Il existe des vecteurs intégratifs, l'ADN s'intègre dans l'ADN de l'hôte, ou non intégratifs, le gène thérapeutique demeure dans la cellule sans s'intégrer au génome de l'hôte. Parmi les virus utilisés, sont retrouvés des rétrovirus comme les lentivirus, des adénovirus et les virus adéno associés, les AAVs.

Les AAVs sont peu immunogènes, contrairement à de nombreux virus ce qui permet de limiter la réponse immunitaire. De plus chez l'Homme les AAVs ne sont pas pathogènes.

Introduction

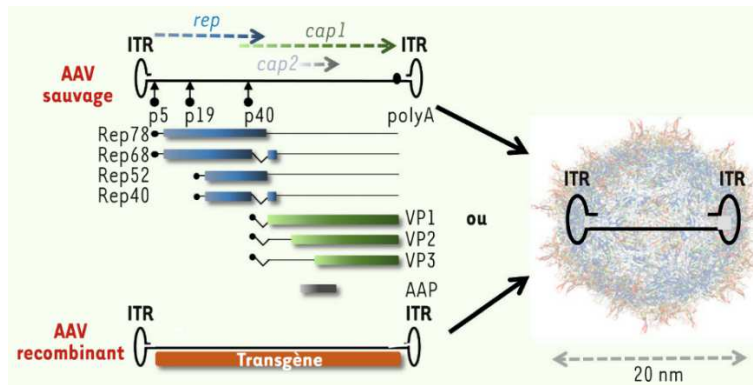


Figure 20 : Le virus adéno-associé à l'état sauvage et sous une forme recombinée.
(Rossi and Salvetti, 2016).

Les AAVs appartiennent à la famille des parvovirus. L'AAV est composé d'une capside de forme icosaédrique non enveloppée de 20 nm, contenant un ADN simple brin de 4,7 kb. Le génome viral contient trois promoteurs et un signal de polyadénylation (Carter, 2000; Carter and Samulski, 2000). Le génome code pour 8 protéines avec un gène *rep* codant pour les protéines de régulation et de réplication Rep (Rep78, Rep68, Rep52, and Rep40), un gène *cap* codant pour les protéines structurales VP (VP1, VP2, VP3) qui forment la capside et un gène *app* codant pour une protéine accessoire AAP (assembly-activating protein) aidant à l'assemblage de la capside. Les séquences nécessaires à sa réplication et son encapsidation sont contenues aux extrémités de son génome dans des petites répétitions terminales ITR (répétition inversée terminale) en forme d'épingle à cheveux de 145 pb, qui servent d'amorces complémentaires pour la synthèse du second brin d'ADN (Figure 20 et Figure 21). Lors d'une infection, le virus se lie aux récepteurs membranaires à la surface des cellules, il est internalisé par endocytose et est dirigé vers le noyau via un trafic dans le système endosomal de la cellule. Il libère ensuite son génome dans le noyau où il va être converti en ADN double brin (Figure 21) (Ding et al., 2005). Les AAVs existent sous différents sérotypes possédant des tropismes tissulaires différents.

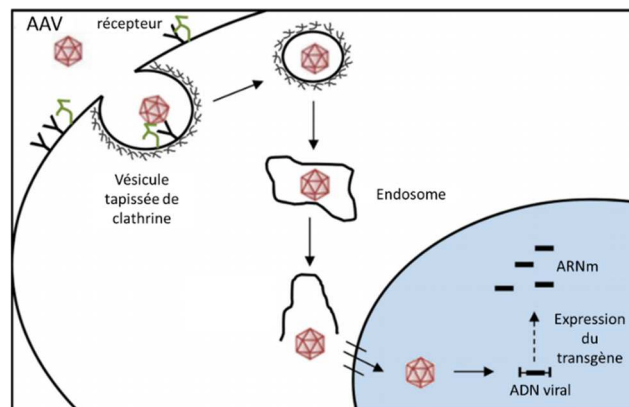


Figure 21 : Entrée et trafic du virus AAV dans la cellule.
Adapté d'après Martini 2011 (Martini et al., 2011).

Introduction

Les vecteurs adéno associés recombinants (AAVr) dérivés des AAVs sont des vecteurs non intégratifs. Les séquences codant pour les protéines virales sont substituées par une cassette d'expression codant pour la transgène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur hétérologue. Les ITRs sont conservés car ils sont indispensables à la réplication (Figure 20).

Un des facteurs limitant à l'usage des AAVr est la présence chez 30 à 50% de la population, d'anticorps neutralisant les AAV préexistants, limitant la possibilité d'utiliser les vecteurs AAVr chez ces individus. Chez les sujets chez qui l'injection est possible, les anticorps neutralisant vont se développer contre le virus dès la première injection, empêchant une réinjection du vecteur. Des études afin de passer outre l'immunisation des patients sont en cours (Louis Jeune et al., 2013).

III.B.3. La thérapie génique ciblant la cascade pathologique des cardiomyopathies dilatées La plupart des approches thérapeutiques en cours de développement pour les DCM ne sont pas spécifiques d'une mutation sur un gène mais ciblent de façon plus globale les voies de signalisation. Les deux principales voies métaboliques ciblées à ce jour sont la voie du cycle calcique et le voie β -adrénergique qui sont liées entre elles (Figure 22).

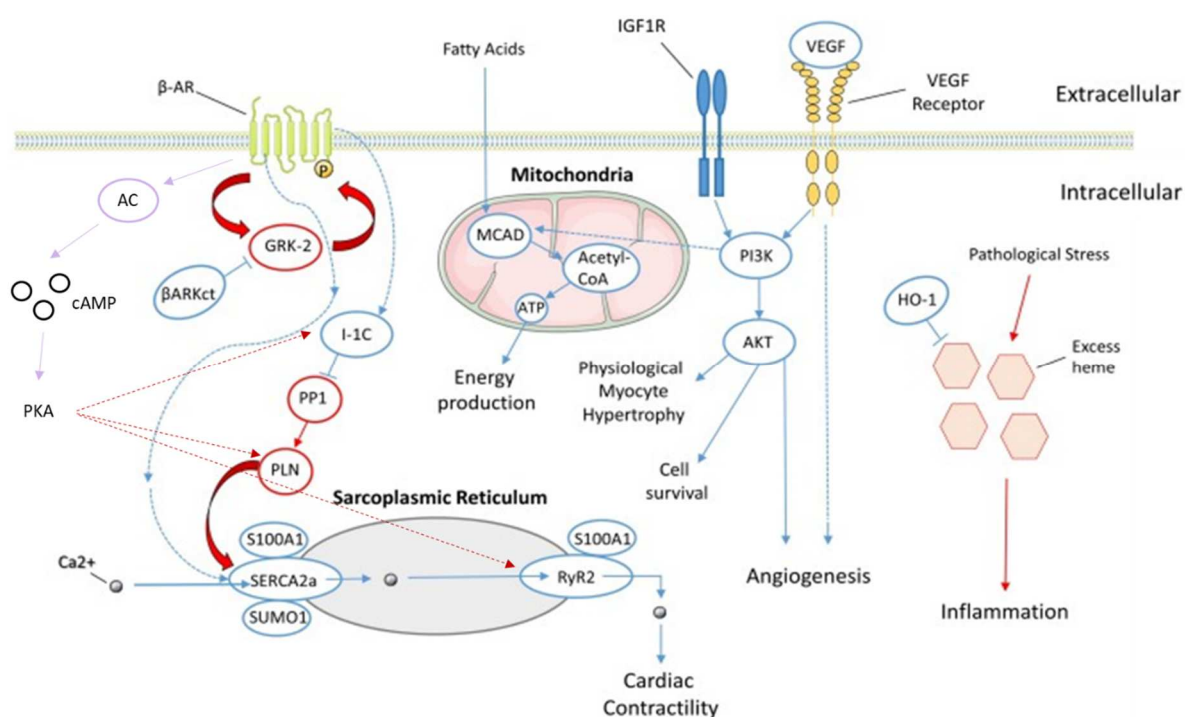


Figure 22 : Les cibles de la thérapie génique pour le traitement de l'insuffisance cardiaque.
Adapté d'après Bass-Stringer 2018 et Bera 2017 (Bass-Stringer et al., 2018) (Bera and Sen, 2017).

III.B.3.a. Thérapie génique ciblant la voie de signalisation du calcium ou la voie β -adrénergique

Une des pistes la plus investiguée pour le traitement de l'insuffisance cardiaque est la correction de l'homéostasie calcique dans le cœur. Un des marqueurs de l'insuffisance cardiaque est en effet un mauvais fonctionnement du réticulum sarcoplasmique qui freine la séquestration du calcium à la fin de la systole. Plusieurs acteurs de l'homéostasie calcique dans le cœur ont été ciblés par des essais précliniques, ce qui a abouti dans quelques cas à un essai clinique.

Le complexe de la pompe calcique ATPase-2 sarcoplasme/endoplasme (SERCA2a) et du phospholamban (PLN), indispensable à la relaxation et la contraction musculaire, a été identifié comme responsable de cycles calciques anormaux dans le cœur et est réduit dans les cas d'insuffisance cardiaque chez l'Homme. Le phospholamban est une petite protéine inhibant l'activité de SERCA2a lorsqu'il est sous la forme de monomère. La phosphorylation du PLN cause la déphosphorylation de SERCA2a et favorise la formation de pentamères inactifs (Figure 22). L'ablation de PLN est donc une stratégie pour restaurer la balance SERCA2a/PLN. L'injection de rAAV-S16EPLN, un mutant pseudophosphorylé du PLN, par voie intracoronaire dans un modèle de DCM chez le hamster a permis l'amélioration de la pression systolique et de la relaxation du ventricule gauche, tout en protégeant les cardiomyocytes d'une destruction de leur membrane (Hoshijima et al., 2002). Une autre approche est de diminuer l'activité de PLN par l'usage de rAAV9shPLN dans un modèle d'insuffisance cardiaque chez le rat avec pour résultat une diminution de la dilatation et de l'hypertrophie, ainsi qu'une augmentation de la fraction d'éjection (Suckau et al., 2009).

L'inhibiteur-1 (I-1C) inhibe l'activité de la protéine phosphatase-1. La protéine phosphatase-1 (PP1) déphosphoryle le PLN qui a son tour inhibe SERCA2a (Figure 22). Chez l'Homme lors d'une insuffisance cardiaque, le taux de PLN est diminué et la protéine phosphatase-1 a une activité élevée qui est en partie attribuée à la réduction de l'activité de l'inhibiteur-1. La diminution de l'inhibiteur-1 associé au PLN est associée à une dérégulation du cycle calcique. Le transfert par AAV9 d'une forme constitutivement active de l'inhibiteur 1 chez le modèle murin d'insuffisance cardiaque restaure la fonction cardiaque et la contractilité, diminue la fibrose par augmentation de la phosphorylation du PLN et augmente l'activité de SERCA2a. Des tests sur modèle de rat et de porc d'insuffisance cardiaque avec réduction de la fraction d'éjection ont également montré des résultats prometteurs après injection intracoronaire du vecteur avec une diminution du remodelage cardiaque et du tissu cicatriciel ainsi qu'une augmentation de la fraction d'éjection, mais les résultats restent modérés (Fish et al., 2013; Ishikawa et al., 2014; Vafiadaki et al., 2013).

Introduction

La protéine phosphatase-1 a également été ciblée pour diminuer directement son activité avec un rAAV9-PP1 β shRNA. PP1 contribue à la pathophysiologie en supprimant indirectement le recaptage du Ca²⁺ par le réticulum sarcoplasmique (Figure 22). Son inhibition permet la restauration de la fonction diastolique et prévient le remodelage ventriculaire après injection intraveineuse chez un modèle murin d'insuffisance cardiaque (Miyazaki et al., 2012).

La protéine de liaison au calcium S1001A augmente l'homéostasie calcique, diminue le remodelage cardiaque et l'hypertrophie. Elle est exprimée préférentiellement dans le cœur et interagit avec le récepteur à la ryanodine type 2 et avec SERCA2 (Figure 22). Il a été montré que la protéine était diminuée dans l'insuffisance cardiaque. Des tests de surexpression par AAV6 et AAV9 de la S1001A sur un modèle porcin d'insuffisance cardiaque par administration rétrograde dans la veine cardiaque n'ont malheureusement pas donné les résultats escomptés malgré une bonne restauration de la contractilité dans le premier essai (Pleger et al., 2011; Weber et al., 2013a).

Le petit modificateur 1 lié à l'ubiquitine (SUMO1) est une protéine post-transcriptionnelle qui agit en stabilisant SERCA2a par la SUMOylation (Figure 22), il est diminué dans les modèles murins d'insuffisance cardiaque. Après injection d'AAV9-SUMO1 chez la souris, une amélioration de la fraction d'éjection a été observée dans un essai préclinique. Chez le porc atteint d'insuffisance cardiaque ischémique, la fraction d'éjection a été améliorée et la taille du ventricule gauche stabilisée (Tilemann et al., 2013).

L'une des voies de signalisation responsable de la stimulation cardiaque, la voie β -adrénergique a également été ciblée. Dans le cœur, l'activation de cette voie permet le renforcement de la force de contraction, l'augmentation de la fréquence cardiaque, de la vitesse de conduction et de l'excitabilité. Le récepteur β -adrénergique (β -AR) est un régulateur de la contractilité cardiaque, sa dérégulation dans les insuffisances cardiaques mène à la surexpression de la protéine G couplée au récepteur kinase (GRK) qui phosphoryle les récepteurs bêta adrénergiques. Le peptide β ARKct a été conçu comme un inhibiteur de GRK (Figure 22). Un vecteur AAV6- β -ARKct dans divers modèles d'insuffisance cardiaque avec réduction de la fraction d'éjection (souris, rats, lapins, porc) après injection rétrograde dans la veine interventriculaire antérieure a montré une amélioration des facteurs hémodynamiques, une augmentation de la contractilité, une diminution de la signalisation adrénergique et un remodelage du ventricule droit (Raake et al., 2012).

La pompe calcique SERCA2a a été la première cible à donner lieu à un essai clinique. Après des tests précliniques concluant dans un modèle porcin, un vecteur AAV1 exprimant SERCA2a a été testé en clinique en 2007 (HF-CUPID : Calcium Up-Regulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease). L'administration intracoronaire du vecteur a montré une diminution des

biomarqueurs et des symptômes ainsi qu'une amélioration de la fonction du ventricule gauche sur un petit nombre de patients présentant une insuffisance cardiaque avancée, cependant les critères de sortie de l'étude n'étaient améliorés que dans la cohorte ayant reçu la plus forte dose de produit. Une seconde étude, CUPID2, de phase IIB sur un plus grand nombre de patients n'a pas montré d'amélioration ni de différence significative dans la cohorte injectée comparée à la cohorte contrôle. Après l'échec de cette étude, deux essais cliniques de phase II utilisant le même produit (NCT01966887 et NCT00534703) ont été interrompus (Greenberg et al., 2016; Hajjar et al., 2008; Jaski et al., 2009; Jessup et al., 2011).

L'adénylyl-cyclase de type 6 (AC6) est une enzyme catalysant la conversion de l'ATP en 3',5'-cyclic-adenosine monophosphate (cAMP) et en pyrophosphates (Figure 22). Elle sert de régulateur à l'activité de SERCA2a dans les cardiomyocytes. L'augmentation de l'AC6 a un effet favorable sur les cardiomyocytes à travers l'activation de la protéine kinase A qui empêche l'inhibition de SERCA2a par le PLN. Dans des tests précliniques, l'administration par adénovirus d'AC6 améliore la fraction d'éjection et le taux de survie (Rebolledo et al., 2006; Tang et al., 2004). Un essai clinique de phase I/II d'un vecteur adénoviral de type 5 encodant l'AC6 par injection intracoronaire (NCT00787059) sur des patients présentant une insuffisance cardiaque avec diminution de la fraction d'éjection n'a pas montré d'amélioration significative de l'état des patients.

L'échec des différents essais cliniques entrepris chez l'Homme pour le traitement de l'insuffisance cardiaque par thérapie génique peut être dû à de multiples facteurs. La voie d'injection utilisée pour les essais peut-être une des causes de diminution de l'efficacité du vecteur par rapport à ce qui était attendu. Ainsi le développement d'AAV avec un tropisme cardiaque supérieur et avec injection intraveineuse pourrait être une solution. Un des autres problèmes pourrait être la durée d'expression du transgène dans les cellules ou encore une dose trop faible de vecteur. Bien que l'efficacité des traitements de thérapie génique dans le cadre des DCM n'ait pas encore été démontrée en clinique, la totalité des essais cliniques et précliniques utilise comme vecteur les adénovirus ou les AAV, et aucun n'a démontré de réaction immunitaire. La thérapie génique par AAV reste donc une sérieuse option pour le traitement des DCM. De nombreuses approches sont en cours d'investigation.

III.B.3.b. Autres cibles de thérapie génique

La forme active de la phosphoinositide 3-kinase (caPI3K) (Figure 22) est une kinase lipidique cardioprotectrice de la voie de signalisation de l'insuline, impliquée dans l'hypertrophie cardiaque physiologique après le sport et le maintien de la contractilité. Son administration par AAV6 restaure la fonction cardiaque et l'angiogenèse dans un modèle de surcharge de pression et diminue le phénotype dans un modèle murin de cardiomyopathie diabétique (Prakoso et al., 2017; Weeks et al., 2012).

Introduction

La chaîne médiane de l'Acyl-coenzyme A déshydrogénase (MCAD) est une enzyme mitochondriale impliquée dans le métabolisme cardiaque, positivement modulé par la PI3K (Figure 22). L'injection par rAAV6 de MCAD chez des souris avec dysfonction cardiaque induite par constriction aortique a induit une hypertrophie physiologique et une protection contre la fibrose cardiaque et le remodelage cardiaque (Bernardo et al., 2018).

La réduction de l'angiogenèse contribuant à la pathogénicité dans l'insuffisance cardiaque, son augmentation a été explorée. Les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) permettent la prolifération des cellules endothéliales (Figure 22). Plusieurs essais pré-cliniques dans des modèles canin et porcin de l'injection des VEGF A et B, ont montré une induction de l'angiogenèse et de l'artériogenèse, améliorant la viabilité des cardiomyocytes et la fonction cardiaque (Ferrari et al., 2006; Pepe et al., 2010; Tao et al., 2011). A noter un essai préclinique utilisant un AAV9 VEGF-B167 par injection intracoronaire dans modèle canin de DCM induit qui a montré conservation de la fonction diastolique et contractile et une atténuation du remodelage cardiaque. Le promoteur utilisé, le peptide natriurétique atrial (ANP) qui est un marqueur fortement augmenté dans l'atteinte cardiaque, a permis une expression du transgène bien supérieure dans les cœurs malades que dans les cœurs sains (Woitek et al., 2015).

Le stress oxydatif est également un facteur délétère dans l'insuffisance cardiaque. L'hème est essentiel au transport de l'oxygène mais est augmentée dans l'insuffisance cardiaque, ce qui induirait un état pro-inflammatoire délétère. Dans un modèle porcin d'insuffisance cardiaque ischémique, l'utilisation d'AAV2/9 pour délivrer l'hème oxygénase (HO-1), une enzyme anti-oxydante impliquée dans le catabolisme de l'hème, permet la diminution de l'inflammation cardiaque et améliore la fraction d'éjection (Hinkel et al., 2015).

La protéine BAG3 (B-cell lymphoma 2 (Bcl2)-associated athanogene-3) intervient dans l'autophagie en tant que co-chaperone pour des protéines de choc thermique (HSP), bloque l'apoptose couplée avec Bcl2 et préserve l'intégrité du sarcomère en couplant les filaments d'actine au disque Z. BAG3 agit sur les β -AR de type 1 et sur les canaux calciques de type L. La mutation du gène *BAG3* est responsable de 2 à 4 % des cardiomyopathies dilatées familiales. Dans les DCM dues à d'autres gènes, les niveaux de BAG3 sont significativement réduits de 50 % dans les cœurs avec une diminution de la fonction du ventricule gauche chez la souris, le porc et l'Homme. Une injection rétro-orbitale d'un AAV9-BAG3 dans un modèle murin d'infarctus du myocarde augmente significativement la fraction d'éjection, la fraction de raccourcissement et le volume systolique (Knezevic et al., 2016).

La relaxine est une hormone ayant des propriétés anti-fibrotiques, principalement par l'inhibition de la surexpression du collagène et la dégradation de celui-ci dans la fibrose pré-existante,

sans altérer le niveau basal de collagène. Des études visant la sur-expression de la relaxine par des adénovirus ont démontré une réversion de la fibrose cardiaque et une amélioration de la fonction cardiaque dans différents modèles de fibrose, chez le rat par voie intracardiaque ou chez la souris par voie systémique (Bathgate et al., 2008; Shuai et al., 2016).

III.B.4. Thérapie génique ciblant spécifiquement un gène

D'autres essais de thérapie génique portent directement sur le gène déficient dans la pathologie.

Dans la δ -sarcoglycanopathie ou LGMD2F, une dystrophie musculaire des ceintures avec un phénotype cardiaque sous forme de DCM, la protéine δ -sarcoglycane est déficiente. Un vecteur r-AAV2deltaSG a été apporté par administration cardiaque à un modèle de hamster. La totalité du complexe sarcoglycane a été restaurée et l'expression de la protéine est demeurée 4 mois (Kawada et al., 2001). Un second test par administration intrapéritonéale et intraveineuse d'un vecteur AAV8-ds delta-SG a permis une diminution de la centronucléation, de la fibrose et de la calcification dans les muscles et le cœur, ainsi qu'une prolongation de l'espérance de vie (Zhu et al., 2005).

III.B.5. La thérapie génique dans les cardiomyopathies dilatées liées à la titine

A l'heure actuelle, aucune thérapie spécifique au traitement des DCM liées à la titine et aux titinopathies n'est disponible. L'approche de thérapie génique par apport d'un gène sain est inenvisageable du fait de la taille colossale du gène *TTN*. Une nouvelle stratégie thérapeutique a été développée en utilisant la technologie du saut d'exon. Dans le cadre de la titine, le saut de l'exon 326 (Gramlich et al., 2015) et de l'exon 335 (Hahn et al., 2019) ont été évaluées in vitro et sur modèle murin et semblent des pistes thérapeutiques prometteuses. Ces exons ont été choisis du fait de la fréquence de leur mutation. Une autre approche se base sur l'inhibition du micro-ARN miR-208b qui a été identifié comme surexprimé chez les patients. L'inhibition de ce miR chez un modèle murin de titinopathie améliore le phénotype cardiaque (Zhou et al., 2017) et pourrait être appliquée chez l'Homme.

III.B.6. La thérapie génique dans la Myopathie de Duchenne

La myopathie de Duchenne étant une des myopathies les plus courante et donc une des plus étudiées, les approches de thérapie génique pour le traitement de la pathologie sont nombreuses et

mettent en jeu différentes stratégies. Les approches de thérapie génique visent à rétablir la dystrophine absente des cellules musculaires, ou une protéine équivalente.

III.B.6.a. Les micro-dystrophines

Le gène de la dystrophine étant très grand il n'est pas possible d'apporter par thérapie génique l'ADN complet dans les cellules musculaires car son matériel génétique à une taille supérieure à 4,7 kb. Plusieurs approches utilisant des gènes de taille réduite sont en cours d'évaluation. La dystrophine ainsi produite est une forme plus courte mais théoriquement active. Le but de l'approche micro-dystrophine (MD) est de reproduire chez les patients DMD un phénotype atténué de la pathologie semblable à un phénotype de patient BMD.

Il existe plusieurs designs de MD différents (Figure 23) dont trois sont actuellement en phase d'essai clinique chez des patients DMD. Le choix des domaines du gène de la dystrophine à intégrer ou qui peuvent être exclus a principalement été fait en se basant sur des dystrophines tronquées retrouvées chez des patients BMD dont les symptômes étaient très atténués. Les domaines amino-terminal et riches en cystéines indispensables à la protéine sont conservés dans tous les vecteurs.

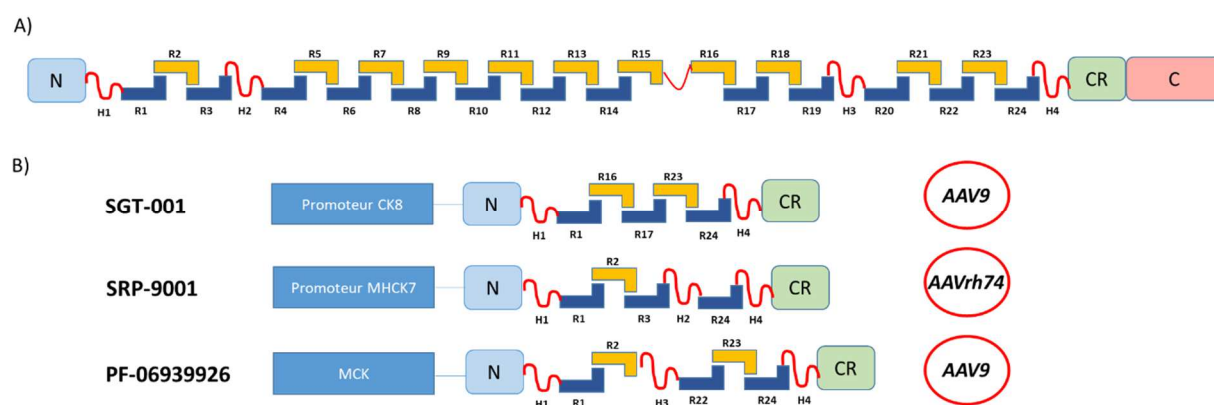


Figure 23 : Les différentes constructions de micro-dystrophine en essai clinique.

A) Dystrophine entière. B) Constructions MD.

Un premier essai clinique porte sur la SGT-001 développée par Solid Biosciences. L'essai de phase I/II (essai NCT03368742) devait prendre fin en 2021. Le vecteur utilisé est un AAV9, la MD comporte les domaines H1, R1, R16, R17, R23, R24 et H4, elle est sous contrôle d'un promoteur cytokératine 8 (CK8). Les doses injectées sont de $5 \cdot 10^{13}$ et $2 \cdot 10^{14}$ vg/kg. Les premiers résultats ont montré que 10 % des fibres musculaires exprimaient la MD à un niveau d'environ 5 % comparé à la normale. L'essai a été momentanément stoppé pour cause de toxicité du produit chez un patient injectée à la dose forte qui a présenté des effets indésirables graves quelques jours après l'injection : diminution des plaquettes, diminution des globules rouges, activation du système du complément,

Introduction

atteinte rénale aigue et insuffisance cardio-pulmonaire. Après traitement de ces signes cliniques, le patient est désormais asymptomatique, mais l'essai a été suspendu par la FDA.

La seconde molécule en essai clinique est la SRP-9001 développée par le Nationwide Children's Hospital en collaboration avec Sarepta. Le vecteur utilisé est un AAVrh74, la MD comporte les domaines H1, R1, R2, R3, H2, R24 et H4, elle est sous contrôle d'un promoteur MHCK7, combinaison des promoteurs MCK, qui encode pour la créatine kinase de type M, et MYH6, qui encode pour la myosine 6. La dose injectée est de $2 \cdot 10^{14}$ vg/kg. Les essais de phase I/II et de phase II (essais NCT03375164 et NCT03769116) prendront fin en 2021. Les premiers résultats des essais cliniques démontrent une forte expression de la MD à 75 % de la dystrophine normale, dans au moins 80 % des fibres musculaires 3 mois après l'injection du vecteur chez trois patients. Les autres patients présentent une expression de la MD dans la quasi-totalité des fibres à un niveau deux fois supérieur à la normale. Une amélioration fonctionnelle a été observée chez tous les patients et le taux de créatine kinase est diminué dans le sang. Il est cependant à prendre en compte dans ces résultats que les patients sont également sous un traitement corticostéroïde pour prévenir d'une éventuelle réponse immune contre les AAVs.

Un dernier essai clinique portant sur la molécule PF-06939926 de Pfizer est en phase I (essai NCT03362502) et prendra fin en 2025. Le vecteur utilisé est un AAV9, la MD comporte les domaines H1, R1, R2, H3, R22, R23, R24 et H4, elle est sous contrôle d'un promoteur MCK. La dose injectée est de 1 à $3 \cdot 10^{14}$ vg/kg. Les premiers résultats de l'étude ont montré un taux moyen de 38 % et de 69 % de fibres positives, ainsi qu'un niveau d'expression de la MD de 23 % et de 30 % respectivement pour la faible et la forte dose.

III.B.6.b. Autres approches de thérapie génique

Le type de thérapie par saut d'exon dépend de la mutation responsable de la DMD, Ces produits ciblent les exons qui sont le plus fréquemment mutés dans la DMD, par exemple le saut d'exon de l'exon 51 est applicable à 13 % des patients. La société Sarepta possède plusieurs candidats en phase clinique. Le SRP-4045 cible l'exon 45 (essais NCT02530905 et NCT02500381) et le SRP-4053 cible l'exon 53 (essais NCT02310906 et NCT02500381). L'Eteplirsén (ou AVI-4658) cible l'exon 51 et possède une autorisation de mise sur le marché (AMM) aux Etats Unis mais pas en Europe car l'efficacité n'a pas été prouvée, une augmentation de la distance de marche parcourue et une amélioration de la fonction pulmonaire sont cependant observés (essais NCT03218995 et NCT02255552). Le Drisapersén, un oligonucléotide visant l'exon 51, produit par GSK a été arrêté après un essai de phase II (essai NCT01910649) qui n'a pas montré de résultats fonctionnels significatifs. Actuellement en cours de

Introduction

développement, le Pip6a-PMO est un oligonucléotide anti-sens ciblant plus particulièrement le cœur, tandis que généralement le muscle squelettique est plus visé (Blain et al., 2018).

L'édition génomique par la technologie CRISPR/Cas9 est également à l'étude. CRISPR/Cas9 est utilisé pour induire une rupture des deux brins de l'ADN à un emplacement spécifique du génome. Cette rupture active le système de réparation de l'ADN qui peut soit entraîner une recombinaison homologue qui corrige la mutation soit une recombinaison non-homologue qui entraîne des insertions et des délétions aléatoires. La recombinaison homologue se déroule uniquement dans les cellules en division et n'est pas applicable aux cellules musculaires post-mitotiques, mais la recombinaison non homologue peut permettre la restauration du cadre de lecture, par exemple en supprimant un, voire plusieurs exons surnuméraires. L'édition génomique requiert la construction de deux vecteurs : un délivrant Cas9 et un autre délivrant l'ARN guide aux cellules. L'édition génomique a été utilisée avec succès pour restaurer l'expression d'une dystrophine raccourcie mais fonctionnelle chez le modèle murin et canin et permet une amélioration du phénotype musculaire et cardiaque dans plusieurs études (Amoasii et al., 2018; Hakim et al., 2018) (Bengtsson et al., 2017) (El Refaey et al., 2017).

GALGT2 est une enzyme de la jonction neuromusculaire impliquée dans la glycosylation, sa surexpression stimule l'expression d'utrophine et améliore le phénotype chez les souris mdx (Xu et al., 2019). Cependant un essai clinique de surexpression de GALGT2 par un vecteur AAVrh74 actuellement en cours n'apporte pour l'instant pas les résultats attendus (essai NCT03333590).

SUJET ET OBJECTIFS DE LA THESE

Cette étude s'inscrit dans le cadre des projets de l'équipe « Dystrophies Des Ceintures » dirigée par le Dr. Isabelle Richard au sein du Généthon. L'objectif de l'équipe est de développer des solutions thérapeutiques pour le traitement des dystrophies musculaires.

La cardiomyopathie dilatée est la forme la plus courante d'atteinte cardiaque associée aux myopathies d'origine génétiques. Elle est caractérisée par une hypokinésie du myocarde et une dilatation des cavités cardiaques, qui sont liés à un remodelage cardiaque important sous la forme d'une atteinte des cardiomyocytes associée à la présence de fibrose. Les DCM constituent actuellement la principale cause d'insuffisance cardiaque et de transplantation cardiaque et il n'existe à ce jour pas de traitement spécifique des DCM. Parmi les myopathies, deux des formes les plus fréquemment associées à des atteintes cardiaques sont les déficiences en titine et en dystrophine. La titine est une protéine géante qui joue un rôle crucial dans l'intégrité du sarcomère et la tension passive musculaire, notamment dans le cœur. La dystrophine, dont les mutations conduisent à la dystrophie musculaire de Duchenne, est une protéine de la structure du sarcolemme indispensable au maintien de l'architecture et à l'intégrité des fibres musculaires au cours des contractions.

Le premier objectif de l'étude a tout d'abord été de caractériser l'atteinte cardiaque observée dans deux modèles portant des mutations dans les deux gènes d'intérêt. Le second objectif a été de définir des perturbations moléculaires communes impliquées dans l'insuffisance cardiaque qui pourraient être ciblées par des approches thérapeutiques. Cette étude a été réalisée à partir de données de transcriptome cardiaque des modèles par un séquençage de l'ARN. Enfin, Le troisième objectif a été, à partir de ces analyses, d'évaluer l'effet de la modulation des cascades moléculaires identifiées par des approches pharmacologiques et par transfert de gène.

MATERIEL ET METHODES

I. Modèles de souris, prélèvement de muscles

I.A. Modèles de souris utilisés

Les souris utilisées dans cette étude sont des mâles de souche titin^{Mex5-/Mex5-} (DeltaMex5) et DBA/2J-mdx (DBA2mdx), ainsi que leurs contrôles respectifs, les souches C57BL/6 et DBA/2. Les souris DeltaMex5 sont des souris dans lesquelles l'avant dernier exon de la Titine est délété par la technologie CRISPR-Cas9 (Charton et al., 2016). Les souris DBA2mdx sont un modèle de myopathie de Duchenne due à une mutation ponctuelle sur l'exon 23 du gène de la dystrophine. Les souris DBA2mdx sont sur un fond DBA/J qui possède une mutation sur le gène LTBP4, une protéine régulatrice de l'activité de la voie de signalisation TGF- β (Fukada et al., 2010). Les souris sont élevées dans des conditions classiques d'élevage : 12h de jour et 12h de nuit, avec alimentation et eau *ad libitum*. Les souris contrôle sont commandées selon les besoins auprès de Charles River France. Toutes les souris sont manipulées conformément aux directives européennes pour les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire par l'homme, et l'expérimentation animale a été approuvée par le Comité d'éthique pour l'expérimentation animale C2AE-51 d'Evry sous les numéros de Demande d'Autorisation de Projet 2015-003-A and 2018-024-B.

I.B. Prélèvement et congélation des muscles

Les animaux sont euthanasiés par surdosage anesthésique suivi d'une élévation cervicale. Les muscles d'intérêt sont prélevés, pesés et congelés dans de l'azote liquide (prélèvements destinés à des analyses de biologie moléculaire) ou dans l'isopentane refroidi (prélèvements destinés à l'histologie), après avoir été placés de façon transversale ou longitudinale sur un bout de liège enduit de gomme arabique. Les cœurs sont figés en diastole avant d'être congelés grâce à une solution de butanedione diluée (5mM) dans du tyrode. Les prélèvements sont ensuite stockés à -80 °C jusqu'à utilisation. Pour le protocole d'observation de la fibrose en Rouge Sirius sur le cœur entier, les cœurs sont inclus entiers en paraffine et conservés à température ambiante. Pour les protocoles de transparençation, les cœurs prélevés sont conservés entier en paraformaldéhyde 4% et conservés à + 4 °C.

II. Histologie

Les muscles congelés en isopentane sont coupés en tranches de 8 μm d'épaisseur, sur un cryostat (LEICA CM 3050) à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Les coupes sont déposées sur une lame, puis stockées à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

II.A. Coloration Hématoxyline-Phloxine-Safran :

Le marquage Hématoxyline-Phloxine-Safran (HPS) permet d'observer l'aspect général du muscle et de mettre en évidence les différentes structures tissulaires et cellulaires. L'hématoxyline colore les acides nucléiques en bleu foncé, la phloxine colore le cytoplasme en rose, le safran colore le collagène en rouge-orangé.

Les coupes transversales sont colorées à l'hématoxyline de Harris (Sigma) pendant 5 min. Après lavage à l'eau 2 min, les lames sont plongées dans une solution d'alcool chlorhydrique à 0,2 % (v/v) 10 s afin d'éliminer l'excédent de colorant. Après un nouveau lavage à l'eau pour 1 min, les tissus sont bleuis dans un bain d'eau de Scott (solution à 0,5 g/l de bicarbonate de sodium et 20 g/l de sulfate de magnésium) pendant 1 min avant d'être de nouveau rincés à l'eau 1 min et colorés à la phloxine 1 % (m/v) (Sigma) pendant 30 s. Après rinçage à l'eau pour 1 min 30 s, les coupes sont déshydratées à l'éthanol 70° pendant 1 min, puis rincées dans l'éthanol absolu 30 s. Les tissus sont ensuite colorés au safran 1 % (v/v dans de l'éthanol absolu) pendant 3 min et rincés à l'éthanol absolu. Pour finir, les coupes sont éclaircies dans un bain de Xylène 2 min puis montées avec une lamelle en milieu Eukitt. L'acquisition des images est réalisée à l'objectif 10 sur un microscope à lumière blanche Zeiss AxioScan couplé à un ordinateur et à une platine motorisée.

A partir des coupes colorées en HPS, l'index de centronucléation est calculé par le rapport du nombre de fibres centronucléées par la surface de la coupe en mm^2 .

II.B. Coloration Rouge Sirius

Cette coloration permet de colorer en rouge les fibres de collagène et de mettre en évidence la présence de tissus fibrotique. Les cytoplasmes sont colorés en jaune.

Les coupes transversales sont déshydratées à l'acétone pendant 1 h pour les coupes congelées ou bien déparaffinées à la chaleur et bains de toluène. Elles sont ensuite fixées au formaldéhyde 4 % pendant 5 min, puis 10 min dans une solution de Bouin. Après deux lavages à l'eau, les lames sont plongées dans la solution de Rouge Sirius (0,1 g de Rouge Sirius pour 100 mL de solution d'acide

picrique) pendant 1 h pour coloration. Après rinçage à l'eau pour 1 min 30 s, les coupes sont déshydratées dans des bains successifs d'éthanol : éthanol 70° pendant 1 min, éthanol 95° pendant 1 min, éthanol absolu pendant 1 min puis second bain d'éthanol absolu pendant 2 min. Pour finir, les coupes sont éclaircies dans deux bains de xylène pour 1 min puis montées avec une lamelle en milieu Eukitt. L'acquisition des images est réalisée à l'objectif 10 sur un microscope à lumière blanche Zeiss AxioScan couplé à un ordinateur et à une platine motorisée.

Les images en lumière polarisée ont été acquises à l'aide d'un microscope LEICA droit modifié avec un polariseur placé avant l'échantillon (Polarizer), le long du trajet de la lumière; et un autre polariseur placé après l'échantillon (Analyzer), qui peut être tourné à la main, donnant ainsi la possibilité d'observer à la fois la lumière transmise et la lumière polarisée en même temps. Les axes principaux des polariseurs sont orientés à 90 degrés les uns par rapport aux autres. Des cartographies en lumière polarisée ont été acquises à l'aide d'un capteur CCD Retiga 2000 (QImaging) couplé au logiciel Cartograph (Microvision, France). En résumé, la lumière passe par le premier polariseur avant d'atteindre l'échantillon, le collagène étant biréfringent la lumière qui le traverse est séparée en deux rayons, qui une fois passés à travers le second polariseur vont permettre l'observation différentielle des deux types de prises du Rouge Sirius et du reste du tissu cardiaque (Figure 24).

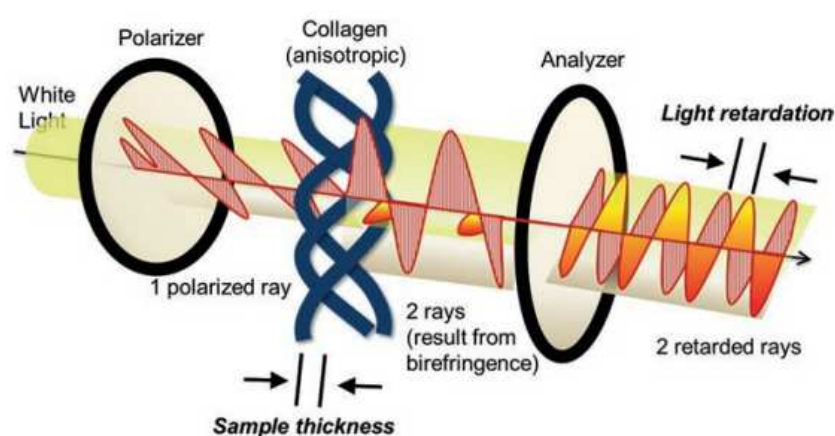


Figure 24 : Principe de la réfringence du collagène en lumière polarisée.

II.B.1. Quantification du Rouge Sirius

II.B.1.a. Sirius Quant

Sirius Quant est un plugin d'ImageJ développé en interne (Schneider et al., 2012). C'est une macro de seuillage qui permet d'isoler et de quantifier les pixels de l'image qui sont colorés en rouge. Il fonctionne en 3 étapes : la première consiste à convertir l'image en noir et blanc. Les images issues des colorations Rouge Sirius sont très contrastées, aussi un simple passage en noir et blanc est suffisant

pour garder la totalité de l'information utile. La seconde est un seuillage très grossier afin de ne garder que les pixels colorés de l'image, autrement dit les pixels appartenant à l'ensemble de la coupe. L'utilisation de la fonction *Analyze Particles* avec une taille d'objet adaptée permet de faire une détection automatique du contour de la coupe, qui est alors mémorisée. La troisième étape est un seuillage manuel de l'utilisateur qui permet de ne garder que les pixels colorés en rouge, ceux qui sont associés au marquage. Un outil de correction manuel permet soit de supprimer des zones qui auraient été détectées et qui ne sont pas du marquage (poussière, repli de coupe, etc.), soit d'ajouter des zones qui n'auraient pas été prises en compte. Une fois que l'image seuillée est satisfaisante, le nombre de pixels seuillés ainsi que le nombre total de pixels sur l'ensemble de la coupe est alors mesuré. Un rapport entre ces deux nombres donne finalement l'indice de fibrose dans la coupe.

II.B.1.b. WEKA

Les images ont été traitées en utilisant un algorithme d'intelligence artificielle via le plugin WEKA (ImageJ). Le plugin classificateur WEKA a été implémenté à l'aide d'un ensemble de données d'apprentissage contenant 17 images représentatives des différentes conditions à classer. Les classes ont été attribuées aux tissus sains (jaune), aux deux types de prises de coloration (rouge et rose) et à la rupture de tranche (blanc). Les cartographies originales sont des images en mosaïque dont la taille est d'environ 225 mégapixels (15k x 15k), qui ont été divisées en 400 cadres (20 lignes, 20 colonnes), chaque cadre mesurant environ 750 x 750 pixels. Chaque image est classée indépendamment et l'image complète est ensuite reconstruite. Le nombre de pixels dans chaque classe est mesuré. Le nombre total de pixels appartenant au cœur est calculé comme la somme du tissu sain et des deux types de prise de colorant. Le rapport de chaque catégorie est ensuite calculé en divisant le nombre de pixels de la catégorie par le nombre total de pixels du cœur.

II.B.1.c. Reconstitution et quantification sur un cœur entier

Les coupes d'un cœur entier coloré par Rouge Sirius ont été scannées au scanner (Axioscan ZI, Zeiss) avec un objectif 10X. Un total de 483 images a été obtenu. Elles ont été alignées en utilisant le plugin d'ImageJ : Linear Stack Alignment with SIFT (Lowe, 2004). Certaines images ont été alignées manuellement lorsque le logiciel ne permettait pas un alignement satisfaisant. L'image a été chargée dans Imaris (BitPlane, USA) pour la reconstruction et la visualisation 3D. Une fois les images alignées, le plugin Sirius Quant en mode totalement automatique utilisant le seuillage Otsu (Otsu, 1979) a permis d'obtenir 483 valeurs de ratio fibrose correspondantes à chaque image. Ces valeurs ont été filtrées en utilisant la méthode de la moyenne glissante qui est une méthode de réduction de bruit dans un signal afin d'éviter les erreurs inhérentes à l'automatisation d'un algorithme. L'utilisation de

la moyenne glissante permet de limiter ces erreurs en remplaçant chaque ratio de fibrose d'une image par la moyenne de lui-même, du ratio de l'image qui la précède et de celui de l'image qui la suit.

II.C. Marquage par immuno-histo fluorescence

Les lames sont sorties du congélateur et mises à sécher à température ambiante pendant 10 min, puis les coupes sont entourées au DAKOpen. Les coupes sont ensuite réhydratées 5 min en PBS 1X. Si la protéine d'intérêt est située dans le noyau, les coupes sont perméabilisées 15 min dans une solution de triton 0,3 % dans du PBS 1X, puis lavées 3 fois en PBS pour 5 min. Les coupes sont ensuite saturées en sérum de chèvre 10 %, sérum de veau fœtal 10 %, PBS 1X pendant 30 min à température ambiante en chambre humide. Le milieu de saturation est remplacé par la solution d'anticorps primaire dilué en PBS 1X + 10 % de solution de blocage sur la nuit à 4 °C en chambre humide. Si l'anticorps est murin, un kit MOM (Mouse on Mouse) est utilisé pour être rajouté à la solution. Quatre lavages successifs en PBS 1X pendant 5 min sont réalisés avant d'hybrider avec la solution d'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome Alexa 488 ou 594 (1/1000) en PBS 1X + 10 % solution de blocage pendant 1 h à température ambiante en chambre humide protégé de la lumière. Une dernière série de quatre lavages de 5 min en PBS 1X est effectué et un montage lames-lamelles en fluoromount contenant du DAPI est réalisé. Les coupes sont ensuite visualisées grâce à un microscope à fluorescence (Zeiss AxioScan ou Leica TCS-SP8 confocal microscope).

Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés en immuno-histologie.

Anticorps	Espèce	Fournisseur	Référence	Dilution
<i>Collagène I</i>	Souris	Abcam	ab6308	1/100
<i>Collagène III</i>	Lapin	Abcam	ab7778	1/100
<i>Fibronectine</i>	Souris	Sigma	F7387	1/200
<i>Vimentine</i>	Souris	Chemicon	MAB3400	1/100
<i>Vinculine</i>	Souris	Sigma	V9131	1/100
<i>Actine F</i>	Souris	Abcam	ab205	1/100
<i>Titine N2B</i>	Lapin	Myomedix	#6678	1/75
<i>Titine M8M9</i>	Lapin	Myomedix	#3375	1/75
<i>Titine IS7-1</i>	Lapin	Genescript	LVEPPPREVVLKTSC	1/2
<i>Titine M10-1</i>	Lapin	Genescript	IEALPSDISIDEGKV	1/75
<i>α-synémine</i>	Lapin	SantaCruz	sc-68849	1/25
<i>Obscurine</i>	Lapin	Atlas Antibody	HPA040066	1/50
<i>Myosprine</i>	Lapin	Abcam	ab75351	1/25
<i>Cilp</i>	Lapin	Biorbyt	orb182643	1/100

II.D. Microscopie à feuille de lumière

II.D.1. Protocole

Décoloration : Les échantillons sont fixés directement après le prélèvement dans un bain de paraformaldéhyde 4 % sur la nuit à 4 °C. Si les échantillons ne sont pas utilisés le lendemain, ils peuvent être conservés dans une solution de PBS supplémentée à 0,002 % de sodium azide à 4 °C. Les échantillons sont rincés 2 fois 1 h en PBS, puis déshydratés dans des bains successifs de PBS contenant une concentration croissante de méthanol (50 % MeOH, 80 % MeOH et 2 fois 100 % MeOH) pour 1 h chaque, sous agitation à température ambiante. Les échantillons sont ensuite décolorés dans une solution de 6 % H₂O₂ en méthanol sur la nuit à 4 °C. Les échantillons sont réhydratés dans des bains successifs contenant une concentration décroissante de méthanol (2 fois 100 % MeOH, 80 % MeOH, 50 % MeOH, et 2 fois 100 % PBS) pour 1 h chaque sous agitation à température ambiante. Les échantillons sont conservés en PBS à +4 °C.

Marquage : Les échantillons sont perméabilisés 4 jours dans une solution contenant 0,2 % de gélatine et 0,5 % de triton en PBS (PBSGT) sous agitation à température ambiante. Toutes les étapes d'incubation des anticorps sont ensuite réalisées à 37 °C avec une rotation de 70 rpm pour augmenter la pénétration de l'anticorps. Les échantillons sont incubés avec l'anticorps primaire dilué en PBSGT et 0,1 % de saponine (10 µg/mL) pour 2 semaines. Les échantillons sont rincés 6 fois 1 h en PBSGT avant d'être incubés dans la solution d'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome Cy3 ou Alexa 647 (1/500) pour 2 jours. Les échantillons sont de nouveau rincés 6 fois 1 h en PBSGT, puis 4 fois 5 min en PBS pour être conservés à 4 °C.

Tableau 3 : Liste des anticorps utilisés pour la microscopie à feuille de lumière

Anticorps	Espèce	Fournisseur	Référence	Dilution
<i>Dystrophine</i>	Souris	Leica	Dys2	1/50
<i>Connexine 43</i>	Lapin	Sigma	C6219	1/200

Transparisation : Les échantillons sont rendus transparents par l'élimination des lipides membranaires en suivant le protocole iDISCO (Renier et al., 2014). Les échantillons sont déshydratés à température ambiante sur une roue agitante à 12 rpm dans les bains de successifs suivants pour 1h dans chaque : 20% MeOH, 40% MeOH, 60% MeOH, 80% MeOH, 2 fois 100% MeOH. Les échantillons sont incubés sur la nuit dans un bain composé au 2/3 de dichlorométhane et de 1/3 de méthanol. Les échantillons sont ensuite rincés 2 fois 15 min en 100 % dichlorométhane pour éliminer totalement le méthanol, avant d'être transférés dans un bain de dibenzyl ether dans lequel l'échantillon va devenir

progressivement transparent en quelques heures. Les échantillons sont conservés en dibenzyl ether à température ambiante protégés de la lumière.

Imagerie : Chaque échantillon rendu transparent a été scanné avec le microscope à feuille de lumière alpha3 (PhaseView, France), en utilisant un objectif 2X longue distance (Nikon). La microscopie à feuille de lumière se base sur l'illumination sélective d'un seul plan d'intérêt par un faisceau laser focalisé dans une direction et collimaté dans l'autre. La feuille de lumière est créée par une lentille cylindrique et projetée dans l'échantillon grâce à un premier objectif. Les fluorophores sont excités et émettent de la lumière collectée par un second objectif (Figure 25).

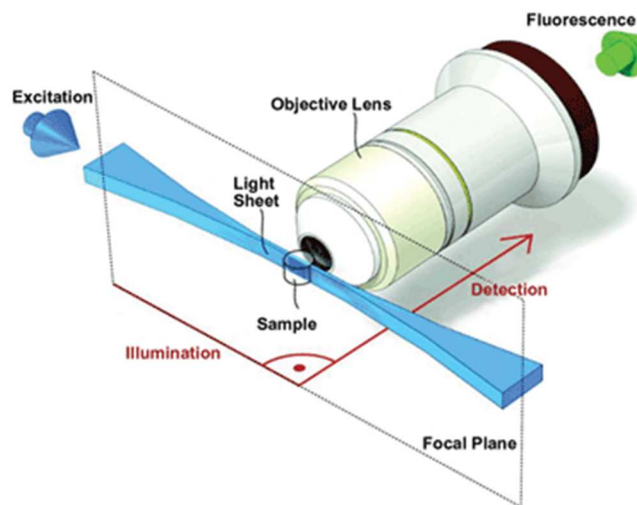


Figure 25 : Principe de la microscopie à feuille de lumière.

II.D.2. Quantification du volume cardiaque

Pour la mesure des volumes ventriculaires, l'imagerie est réalisée avec un laser bleu 488 nm afin d'exciter particulièrement l'autofluorescence des tissus et de faire une reconstitution structurelle de l'organe. Les reconstructions sont faites à partir d'environ 2500 images prises tous les 2 μm avec une résolution d'environ 6 μm . Pour chaque cœur, plusieurs piles d'images sont réalisées. Les images sont alignées les unes par rapport aux autres grâce au logiciel Imaris Stitcher (Bitplane, USA). Les images sont ensuite analysées sur le logiciel IMARIS (Bitplane, USA). Un seuillage est effectué en se basant sur l'intensité de signal. Ensuite, le seuil est ajusté visuellement en rapport avec la visualisation 3D de l'objet. Le logiciel crée un objet volumétrique en 3D. Une délimitation est manuellement dessinée pour chaque cœur toutes les 100 images environ afin de générer un volume correspondant au volume total du cœur.

II.E. Microscopie électronique

II.E.1. Immuno-électro microscopie

Le marquage des épitopes de la bande M de la titine par immuno-électro microscopie (IEM) est effectué sur des faisceaux de muscle papillaire et de soléaire. Les muscles sont étirés à environ 25 % et fixés dans du paraformaldéhyde à 3,7 % dans du PBS 10 mM pendant 30 min à 4 °C. Après rinçage dans du PBS, les muscles sont incubés avec de la glycine 50 mM dans le même tampon, puis bloqués avec 0,5 % d'albumine sérique bovine (BSA) dans du PBS contenant inhibiteurs de protéase et 0,05 % de Tween 20, 1 h à 4 °C. Après blocage, les faisceaux musculaires sont incubés 48 h à 4 °C avec les anticorps primaires (Tableau 4), puis une nuit avec l'anticorps secondaire AlexaFluor-568 de chèvre anti-lapin igG (ab175471, Invitrogen, 2 mg/ml). Les faisceaux de tissu sont fixés avec 3 % de glutaraldéhyde et traités pour la microscopie électronique à transmission comme expliqué ci-dessous.

Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés en immuno-électro microscopie.

Anticorps	Espèce	Fournisseur	Dilution
<i>anti-M8M9</i>	Lapin	BioGenes, Germany	0,35 mg/mL
<i>anti-Is7</i>	Lapin	GenScript, NJ, USA	0,724 mg/mL
<i>anti-M10</i>	Lapin	GenScript, NJ, USA	0,824 mg/mL

II.E.2. Microscopie électronique à transmission

Les muscles sont étirés et fixés par un mélange de 3,7 % de paraformaldéhyde, 3 % de glutaraldéhyde et 0,2 % d'acide tannique dans du PBS 10 mM, à pH = 7,2 pendant 1 h à 4 °C. Ceci est suivi d'une postfixation à 1 % OsO₄ dans le même tampon pendant 30 min à 4 °C. Les échantillons sont ensuite déshydratés par des bains de concentration en éthanol croissante, infiltrés avec de l'oxyde de propylène et transférés dans un mélange d'oxyde de propylène, d'Araldite 502 et de résine Embed 812, pour polymériser pendant 48 h à 60 °C. Des coupes longitudinales ultrafines de 90 nm sont obtenues avec un ultramicrotome (Reichert-Jung) et contrastées avec du permanganate de potassium à 1 % et du citrate de plomb. Les échantillons sont observés dans un microscope électronique à transmission TECNAI Spirit G2 (FEI, Hillsboro, OR) avec une caméra numérique AMT Image Capture Engine V6.02 (4Mpix) à 100 kV.

II.E.3. Mesure des sarcomères

La mesure des sarcomères se fait sur le logiciel ImageJ, en utilisant l'outil « line profile tool ». Les images de microscopie électronique sont d'abord mises à l'échelle (500 nm = 150 pixels), puis

calibrées. A l'aide de l'outil « line profile tool », une droite rejoignant les deux disques Z d'un même sarcomère (Figure 26A) est tracée. Ensuite, la fonction « plot profile » est utilisée pour définir le profil d'intensité sur l'échelle de gris (Figure 26B). Chaque bande peut ainsi être mesurée en traçant un carré la délimitant, au sein duquel la densité intégrée est calculée.

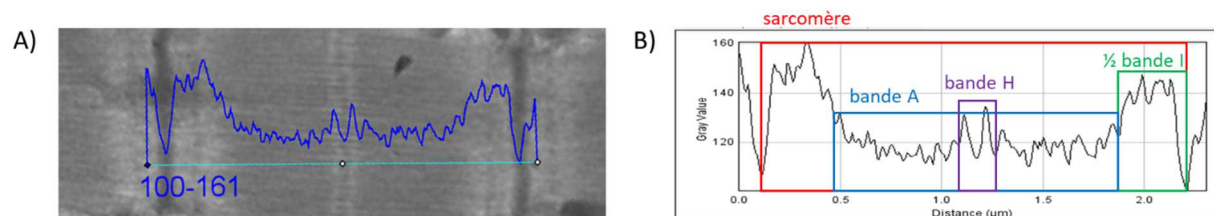


Figure 26 : Mesure de la longueur des sarcomères.

A) Image de microscopie électronique d'un sarcomère avec profil d'intensité. B) Positionnement des différents composants du sarcomère sur le profil : sarcomère, bande A, bande H et bande I.

III. Etude de l'ARN

III.A. Extraction et quantification des ARN

Les muscles congelés en isopentane sont coupés en tranches de 30 µm d'épaisseur, sur un cryostat (LEICA CM 3050) à -20 °C, séparés en tubes eppendorf d'environ 10-15 tranches, puis stockées à -80 °C. La méthode d'extraction des ARN totaux par la méthode dite « au TRIzol® », basée sur les propriétés de solvabilité des acides nucléiques dans les solvants organiques, est utilisée.

Les tubes de récupération de muscle sont repris par 0,8 mL de TRIzol® (ThermoFisher) supplémenté en glycogène (Roche) à raison de 0,5 µL/mL de TRIzol®. Les tubes sont placés dans l'homogénéisateur FastPrep-24 (Millipore) pour un cycle de 20 s, 4 m.s. Pour récupérer les acides nucléiques, après une incubation de 5 min sur glace, 0,2 mL de chloroforme (Prolabo) sont ajoutés et mélangés au TRIzol®. Après une incubation de 3 min à température ambiante, les deux phases, aqueuse et organique, sont séparées par centrifugation à 12000 g pendant 15 min à 4 °C. La phase aqueuse, contenant les acides nucléiques, est prélevée et déposée dans un nouveau tube. Les ARN sont ensuite précipités par ajout de 0,5 mL d'isopropanol (Prolabo) suivi d'une incubation de 10 min à température ambiante, et centrifugation pendant 15 min à 12000 g à 4 °C. Le culot d'acides nucléiques est lavé par 0,5 mL d'éthanol 75 % (Prolabo) et à nouveau centrifugé 10 min à 12000 g à 4 °C, puis séché à l'air libre. Les acides nucléiques sont repris dans 50 µL d'eau nuclease free, 20 µL sont mis de côté pour réaliser une analyse de l'ADN viral, 30 µL sont additionnés de RNAsin (Promega) diluée au 1/50 pour préserver les ARN de la dégradation. Les ARN sont ensuite traités à la TURBO Dnase

(Ambion) pour éliminer l'ADN résiduel. Un double traitement à la Dnase est effectué pour les échantillons destinés au séquençage.

Pour l'analyse de transcriptome spécifique des voies de signalisation, des plaques RT² Profiler PCR Array (Qiagen) sont utilisées. Les plaques de criblage nécessitent l'utilisation d'un kit compatible pour extraire l'ARN, le kit d'extraction RNeasy Mini Kit (Qiagen) qui extrait l'ARN sur colonnes. Le kit est utilisé en suivant les instructions du fournisseur, et les ARN sont ensuite traités par la RNase Free DNase (Qiagen).

Une lecture de DO est ensuite réalisée sur le spectrophotomètre ND-8000 (Nanodrop), à partir de 2 µL d'ARN pour déterminer leurs concentrations. Les ARN sont conservés à -80 °C et les ADN à -20 °C.

III.B. Mesure de la qualité des ARN

Dans le cas des ARN préparés pour le séquençage, la qualité des ARN est mesurée sur le Bioanalyseur 2100 (Agilent) qui réalise l'électrophorèse capillaire d'acides nucléiques puis leur analyse. La visualisation de la qualité se fait par la vitesse de rétention et la concentration de l'échantillon sous forme d'électrophorégrammes. Un score de qualité exprimé en RIN (pour *RNA Integrity Number*) est calculé pour chaque échantillon, sur une échelle de 0 à 10. La puce *RNA Nano* (Agilent) est utilisée en suivant les instructions du fournisseur. Un marqueur de taille (RNA 6000 Nano Ladder, Agilent) est passé en premier, pour permettre l'évaluation de la taille des ARN dans les échantillons. Un marqueur est ajouté à chaque échantillon, sortant à une taille définie. Pour chaque échantillon, 1 µL d'ARN est déposé sur la puce. Sur l'électrophorégramme de l'ARN, les pics d'ARN ribosomal sont observés : 28S (vers 4000 nt), 18S (vers 2000 nt) et 5S (vers 100 nt). Le marqueur interne sort à la position de 25 nt. Le RIN est calculé en fonction de la hauteur et de la position des pics 18S et 28S, du rapport entre les pics 5S, 18S et 28S, et du rapport entre signal et bruit. Pour le RNA-seq, la qualité requise nécessite un RIN d'au moins 7.

III.C. PCR quantitative en temps réel

Les ADN génomiques et viraux sont quantifiés par qPCR et l'expression des gènes par RT-qPCR. La RT-PCR quantitative en temps réel est la mesure de la quantité d'un transcrite spécifique dans un échantillon d'ARN. Elle se compose de deux étapes : la transcription inverse des ARN en ADNc et la PCR quantitative sur les ADNc.

III.C.1. Transcription inverse

La transcription inverse est la synthèse d'un brin d'ADN à partir d'une matrice d'ARN grâce à une ADN polymérase ARN-dépendante encore appelée transcriptase inverse pour obtenir un ADNc. Pour l'amplification d'ARN messagers, l'étape de transcription inverse est faite sur la totalité des ARN messagers, à l'aide du kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo-Fisher). Deux types d'oligonucléotides : des hexamères dits « random », contenant des séquences aléatoires, et des oligonucléotides « dT », polymères de déoxy-thymine, s'hybridant aux séquences polyA permettant de générer des ADNc dans leur intégralité. Le mix utilisé est présenté dans le Tableau 4.

Tableau 5 : Mélange réactionnel pour la transcription inverse.

Produit	quantité
ARN	1 µg
Hexamères random + 1/10 OligodT	50 ng
Tampon de réaction 5X	1/5
dNTP	500 µM de chaque
Ribolock Rnase Inhibitor 40U/µl	0,25 U
RevertAid H-Minus 200U/µL	200 U
Eau	qsp 20 µL

Le mélange est placé dans un thermo cycleur pour le cycle suivant : 10 min à 25 °C, puis 1h15 à 42 °C, température d'action de l'enzyme, puis l'enzyme est inactivée 10 min à 70 °C. Les ADNc sont stockés à court terme à +4 °C ou à -20 °C à long terme.

III.C.2. PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative en temps réel est réalisée soit sur les ADN génomiques ou viraux pour la titration des vecteurs et la mesure du nombre de copie de vecteur dans les tissus, soit sur l'ADNc obtenu à partir d'ARN pour la quantification de transcrits. L'activité nucléasique de l'enzyme Thermo-Start DNA Polymerase contenue dans le mix ABSolute QPCR ROX Mix (ThermoFisher) permet la détection de produits de PCR à chaque cycle d'amplification par libération d'un rapporteur fluorescent. Ce rapporteur fluorescent est un fluorophore (FAM, pour 6-carboxyfluorescéine ou VIC, pour 2'-chloro-7'phenyl-1,4-dichloro-6-carboxy-fluorescein) est situé en 5' de la sonde nucléotidique qui est également marquée par un *quencher* (TAMRA, pour tétraméthylrhodamine) en 3'. La séparation du rapporteur et du *quencher* entraîne l'apparition de la fluorescence du rapporteur, qui est mesurée par l'appareil. Les mélanges pour chaque gènes d'intérêt sont composés des deux oligos F (forward, sens) et R (reverse, anti-sens) à 0,2 mM et de la sonde à 0,1 mM correspondante. Des mélanges commerciaux d'amorces 20X Taqman Gene Expression Assay (ThermoFisher) correspondant aux ARNm à quantifier portant le rapporteur FAM sont utilisés (Tableau 7). Le gène de l'acide

ribophosphoprotéique RPLP0 codant pour une protéine ribosomale, invariante dans les différentes conditions, a été choisi comme gène normalisateur en utilisant le rapporteur VIC. Les primeurs et la sonde Taqman utilisés pour l'amplification de RPLP0 sont les suivants : m181PO.F (5'-CTCCAAGCAGATGCAGCAGA-3'), m267PO.R (5'-ACCATGATGCGCAAGGCCAT-3') et m225PO.P (5'-CCGTGGTGCTGATGGGCAAGAA-3'). La réaction de PCR se passe dans des plaques 384 puits, chaque puit est déposé en dupliquât selon les quantités du Tableau 6.

Tableau 6 : Mélange réactionnel pour la PCR quantitative.

produit	quantité
ADN	50 ng
Thermo Scientific Absolute qPCR ROX Mix	1X
TaqMan Gene Expression 20X FAM	0,5X
Normalisateur RPLP0 20X VIC	0,5X
Eau	qsp 10 µL

Le programme de PCR suivant est appliqué : pré-incubation 15 min à 95 °C, puis 45 cycles d'amplification de 15 sec à 95 °C suivies de 1 min à 60 °C en utilisant le LightCycler480® (Roche).

Tableau 7 : Liste des amorces Taqman Gene Expression utilisées.

Gène	Référence	Gène	Référence
<i>miR 142-3p</i>	hsa-miR-142-3p	<i>Tgfb1</i>	Mm01178820_m1
<i>miR 21</i>	hsa-miR-21	<i>Ctnnb1</i>	Mm004893039_m1
<i>miR 31</i>	mmu-miR-31	<i>mCilp</i>	Mm00557687_m1
<i>Col1a1</i>	Mm00801666_g1	<i>hCilp</i>	Hs01548460_m1
<i>Myh8</i>	Mm01329494_m1	<i>GFP</i>	Mr 03989638
<i>Tmem8c</i>	Mm00481256_m1	<i>mLtbp2</i>	Mm01307379_m1
<i>Nppa</i>	Mm01255747_g1	<i>hLtbp2</i>	Hs00166367_m1
<i>Myh7</i>	Mm0060555_m1	<i>mWisp2</i>	Mm00497471_m1
<i>Myh6</i>	Mm00440359_m1	<i>hWisp2</i>	Hs1031984_m1
<i>Fn</i>	Mm01256744_m1	<i>mDkk3</i>	Mm00443800_m1
<i>Vim</i>	Mm01333430_m1	<i>hDkk3</i>	Hs00247429_m1
<i>Col1a1</i>	Mm00801666_g1	<i>mSfrp2</i>	Mm01213947_m1
<i>Col3a1</i>	Mm00802300_m1	<i>hSfrp2</i>	Hs00293258_m1
<i>Timp1</i>	Mm01341361_m1		

III.C.3. Expression des résultats

La quantification des cycles est calculée avec le logiciel LightCycler® 480 SW 1.5.1 (Roche) en utilisant la méthode de dérivée seconde maximale. Les résultats de PCR quantitative sont exprimés en terme de « Cq », c'est-à-dire le nombre de cycles au bout duquel une valeur de fluorescence seuil est atteinte. Cette valeur est ensuite normalisée par la valeur obtenue pour le gène de référence RPLP0.

III.C.4. RT2 Profiler PCR Arrays

Les kits de PCR d'étude de la mitochondrie (PAMM-087Z) et de screening des cibles des voies de signalisation WNT (PAMM-243Z) et TGF-B (PAMM-235Z) sont utilisés conformément aux instructions du fabricant (RT2 Profiler PCR Arrays, Qiagen). L'extraction d'ARN est réalisée à partir de tissus congelés à l'aide du kit de tissus RNasy[®] Microarray (Qiagen) et traitée avec un le kit RNase-Free DNase set (Qiagen). L'ADNc est obtenu à partir de 500 ng d'ARN en utilisant le kit RT2 first strand kit (Qiagen) et est utilisé comme matrice pour la PCR. La qRT-PCR est réalisée en utilisant le LightCycler480[®] (Roche).

III.D. Séquençage de l'ARN

III.D.1. RNAseq

Les échantillons utilisés pour le séquençage sont des ARN totaux extraits au TRIzol, traités 2 fois à la DNase et ayant une qualité de RIN > 7. Les échantillons de 2µg d'ARN à 100 ng/µL ont été envoyés à séquencer au Karolinka Institutet. La librairie de séquençage utilisée a été préparée avec le kit TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit (Illumina) et le séquençage a été effectué selon le protocole Illumina. Les *reads* sont associés en utilisant Fastq-pair et alignés au génome murin (mm10) en utilisant STAR aligner. Le nombre de *reads* est proportionnel à l'abondance des ARN correspondants dans l'échantillon. La plate-forme de séquençage fournit ensuite plusieurs fichiers par échantillon, contenant les fichiers d'alignement en format *bam*, la liste des gènes identifiés avec le nombre de *read* pour chaque échantillon comparé et la liste des gènes accompagnés d'une valeur numérique de comptage normalisée exprimée en fragments par kb par million de *reads* (FPKM).

III.D.2. Analyse

Une fois reçus les fichiers contenant les listes des transcrits séquencés, la première étape pour comparer les échantillons entre eux a été de fusionner les fichiers des différents échantillons. Le but est d'obtenir un tableau unique contenant, pour chaque transcrit identifié dans l'étude, son nombre de *read* dans chaque échantillon. Ensuite, une analyse sous le logiciel R a été effectuée avec le package DESeq2 : à partir du nombre de *read*, les échantillons sont normalisés, et l'expression différentielle des gènes pour chaque échantillon est calculée par rapport à son contrôle. Les valeurs de différence d'expression (ou fold change) sont exprimées en logarithme binaire (log₂.FC), elles sont associées à leur Pvalue ajustée *padj*. Ensuite, une étape de tri a été effectuée pour supprimer : les gènes contenant moins de 10 *reads* dans toutes les conditions, les gènes dont aucune *padj* n'est significative, les gènes

dont le log₂.FC est compris entre -0,5 et 0,5 pour toutes les conditions. Le tableau final a été utilisé pour identifier les gènes exprimés significativement de façon différentielle entre les différentes conditions.

III.D.3. Représentation graphique

L'alignement des *reads* sur le génome murin (mm10) peut être observé par visualisation des fichiers *bam* avec le logiciel *Integrative Genomic Viewer* (IGV, Broad Institute). Différents packages de R sont utilisés pour la représentation graphique des résultats de RNAseq. Pour les Diagrammes de Venn, le package *VennDiagram* est utilisé. Pour les Volcano Plots, le package *ggplot2* est utilisé. Le logiciel *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA, Qiagen) et le système de classification d'ontologie génique *PANTHER* sont utilisés pour visualiser les voies de signalisations dérégulées dans le jeu de données.

IV. Extraction de protéines et Western Blot

IV.A. Isoformes de la Titine et Western Blot Titine

Du fait de sa grande taille, la titine nécessite l'utilisation de protocoles d'extraction et de migration spécifiques. Les muscles congelés sont broyés à l'aide d'un pilon dans de l'azote liquide, puis solubilisés dans un tampon urée (8 mol/L d'urée, 2 mol/L de thio-urée 0,05 mol/L de tris-HCl, 0,075 mol/L de dithiothreitol (DTT) avec 3 % de SDS et 0,03 % de bleu de bromophenol, pH=6,8) et 50 % de glycérol (contenant des inhibiteurs de protéase : 0,04 mol/L d'E64, 0,16 mol/L de leupeptin et 0,2 mol/L de PMSF) pour 14 min à 60 °C. Après centrifugation 13 min à 13 000 g, le surnageant est conservé à -80 °C.

L'analyse des isoformes de la titine est réalisée après dépôt de 5 dilutions successives des échantillons sur un gel à 1 % d'agarose et 3 h 30 min de migration à 15 mA. Les gels sont ensuite colorés au Bleu de Coomassie, scannés puis analysés avec le logiciel One-D scan (Scanalytics Inc). La densité optique de la titine et de la chaîne lourde de la myosine est déterminée en fonction des volumes de dilution. La pente de la relation obtenue permet de quantifier les ratios d'expression protéique.

Pour les western blots, les échantillons sont déposés sur un gel à 0,8 % d'agarose. Après migration les gels sont transférés par transfert semi sec 2 h 30 min à 1,3 mA/cm² sur membrane PVDF (polyvinylidene difluoride) puis colorés au Rouge Ponceau pour visualiser le transfert total des protéines, et décolorées. Les membranes sont ensuite saturées 1 h en tampon de blocage (*Blocking Buffer*, Li-Cor) dilué au ½ en PBS, puis hybridée avec un anticorps primaire (Tableau 8) en tampon *Blocking Buffer* dilué au ½ en PBS, additionné de 0,5 % de Tween20, pendant une nuit à +4 °C. Une

série de 4 lavages est ensuite effectuée, en tampon *Tris Buffered Saline* (TBS, Sigma) complété en Tween20 à raison de 0,1 % en volume. Une deuxième étape d'hybridation est réalisée avec un anticorps secondaire couplé à une molécule fluoresçant dans l'infrarouge (soit à 680 nm ou à 800 nm de longueur d'onde), dirigé contre l'espèce de l'anticorps primaire, dilué au 1/5000 en tampon *Blocking Buffer* dilué au ½ en PBS, additionné de 0,5 % de Tween20 et de 0,2 % de SDS. Une série de 4 lavages en TBS-Tween est à nouveau effectuée. Enfin, la membrane est rincée en PBS, puis scannée en infra-rouge sur le lecteur Odyssey (Li-Cor). La quantification des western blots est effectuée grâce au logiciel Image Studio.

Tableau 8 : Liste des anticorps utilisés en Western blot.

Anticorps	Espèce	Dilution	Source	Référence
<i>Titine Z1Z2</i>	souris	1/2500	Abnova	H00007273-M06
<i>Titine Z1Z2</i>	lapin	1/2000	Myomedix	
<i>Titine M1</i>	souris	1/1000	UofA	34892
<i>Titine IS5</i>	lapin	1/1000	(Charton et al., 2015)	
<i>Titine IS6</i>	lapin	1/1000	(Zastrow et al., 2006)	5460
<i>Titine M8m9</i>	lapin	1/2500	Myomedix	
<i>Titine IS7</i>	lapin	1/2500	(Charton et al., 2016)	LVEEPPPREVVLKTSC
<i>Titine M10</i>	souris	1/1000	(Evilä et al., 2014)	11-4-3 _ QGRFHI
<i>Titine M10-1</i>	lapin	1/2500	(Hackman et al., 2008)	IEALPSDISIDEGKV
<i>Cilp</i>	lapin	1/250	biorbyt	orb182643

IV.B. Western Blot classique

En dehors de la titine, la mise en évidence des autres protéines se fait par la réalisation de western blots plus conventionnels. Les muscles congelés en isopentane sont coupés en tranches de 30 µm d'épaisseur, sur un cryostat (LEICA CM 3050) à -20 °C. Les échantillons de muscle obtenus sont ensuite broyés à l'aide de pistons, dans 0,5 mL de tampon RIPA (ThermoFisher) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktai, Roche). Les protéines totales sont dosées à l'aide du kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific) pour diluer les échantillons à une quantité équivalente. Le cas échéant, le kit ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction (Merk Millipore) est utilisé conformément au protocole fourni pour séparer les différentes fractions cellulaires à partir des échantillons de tissu : le cytosol, les membranes, le noyau et le cytosquelette.

Les protéines obtenues sont mélangées avec du tampon Laemmli (Biorad) contenant un agent réducteur, le dithiothréitol (DTT), et dénaturées par incubation 5 min à 95 °C. Une fois dénaturées, les protéines sont déposées sur gel de polyacrylamide précoulé (Biorad, gel Tris-Glycine 4-15 %), séparées

par électrophorèse puis transférées sur membrane de nitrocellulose (Biorad) grâce au système de transfert Trans-Blot® Turbo (Biorad).

La membrane ainsi obtenue est saturée 45 min en tampon *Blocking Buffer* (Li-Cor) dilué au ½ en PBS, puis hybridée avec un anticorps primaire (Tableau 8) pendant une durée soit de 2 h à température ambiante, soit d'une nuit à +4 °C. Une série de 4 lavages est ensuite effectuée, en tampon TBS complété en Tween20 à raison de 0,1 % en volume. Une deuxième étape d'hybridation est réalisée avec un anticorps secondaire couplé à une molécule fluoresçant dans l'infrarouge (soit à 680nm ou à 800nm de longueur d'onde), dirigé contre l'espèce de l'anticorps primaire, dilué au 1/5000 en tampon *Blocking Buffer*. Une série de 4 lavages en TBS-Tween est à nouveau effectuée. Enfin la membrane est rincée en PBS, puis scannée en infra-rouge sur le lecteur Odyssey (Li-Cor). Les protéines marquées par un anticorps secondaire 680 nm apparaissent en rouge, tandis que celles marquées par un anticorps secondaire 800 nm sont visibles en vert.

IV.C. Test ELISA

Le test immunologique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) LS-F16334-1 Human CILP (LSbio) dirigé contre la protéine CILP a été réalisé selon les recommandations du fournisseur à partir d'échantillons de tissus cardiaque et de sérums.

V. Analyse fonctionnelle

V.A. Analyse de la fonction musculaire

Les muscles isolés sont conservés dans une solution de Ringer (pour 500 mL : NaCl 4 g ; KCl 0,186 g ; NaH₂PO₄ * H₂O 0,069 g ; NaHCO₃ 1,008 g ; CaCl₂ * 2H₂O 0,147 g ; MgSO₄ * 7H₂O 0,123 g et glucose 0,990 g), pH = 7,5, oxygénée (95 % O₂ et 5 % de CO₂) et maintenue à 30 °C. Le muscle est placé dans une cuve et relié au capteur de force. Il est stimulé électriquement à l'aide d'électrodes situées le long de la cuve, parallèlement au muscle. Pendant toute la durée des tests, la solution de Ringer oxygénée circule dans la cuve. Le muscle est mis en tension entre les deux tendons, et les sutures sont fixées par une contraction à 150 Hz. La longueur L₀ (longueur pour laquelle le muscle développe sa force maximale) est déterminée en augmentant progressivement la tension appliquée sur le muscle. Une fois L₀ trouvée, les tests sont réalisés dans l'ordre suivant : mesure de la force, mesure de l'étirement passif et enfin mesure de la fatigabilité, avec 7 min de repos minimum du muscle entre chaque test. La mesure de la force est réalisée sur le muscle réglé sur L₀, soumis à une augmentation progressive de la fréquence des contractions de 1 à 200 Hz, chaque contraction dure 0,2 ms.

Matériel et Méthodes

L'étirement passif du muscle est réalisé sur le muscle après détermination de sa longueur sous tension minimum, puis le muscle est étiré progressivement. La fatigabilité du muscle est mesurée à partir de la L₀, le muscle est soumis à 75 répétitions à un intervalle de 40 s pour le SOL et 60 s pour l'EDL.

Pour chaque mesure, le stress subi par le muscle est ajusté à partir de la surface de section physiologique (PCSA), qui est utilisée pour estimer le nombre de fibres musculaire :

$$PCSA = \frac{m \times \cos(\theta)}{\rho \times L_f}$$

avec : m = masse du muscle en mg

θ = Angle de pennation (angle que forment les fibres musculaires par rapport à l'axe selon lequel le muscle exerce une force de contraction concentrique)

θ_{EDL} = 8,3°

θ_{SOL} = 8,5°

ρ = densité du muscle = 1,056 * mg/mm³

L_f = ratio de la longueur de la fibre = longueur muscle (mm) * 0,73 (SOL) et 0,51 (EDL)

PCSA_{SOL} = masse du muscle * cos 8,5 / (1,056 * longueur du muscle * 0,73)

PCSA_{EDL} = masse du muscle * cos 8,3 / (1,056 * longueur du muscle * 0,51)

Force ajustée (N/cm²) = force (g) * 9,81 / PCSA

V.B. Analyse de la fonction cardiaque.

V.B.1. Echographie

Les souris sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane et placées sur une plateforme chauffante (VisualSonics). La température et le rythme cardiaque sont en permanence monitorés. La prise d'image est réalisée par un échocardiographe à haute fréquence Vevo 770 (VisualSonics) avec sonde 707B. Les mesures échographiques en mode 2D et mode M (mouvement) sont prises selon le grand et le petit axe parasternal au niveau le plus large du ventricule gauche. Les mesures quantitatives et qualitatives sont réalisées en utilisant le logiciel de l'appareil Vevo 770. La masse du ventricule gauche est estimé à partir de la formule suivante :

Masse du ventricule gauche (g) = 0,85 (1,04 ((diamètre du ventricule gauche en fin de diastole + épaisseur du septum intraventriculaire en fin de diastole + épaisseur du mur postérieur en fin de diastole)³ – diamètre du ventricule en fin de diastole³)) + 0,6

Pour chaque échographie du cœur d'une souris, environ 5 points de mesure sont pris. Le point de mesure correspondant à la taille maximale du ventricule gauche en diastole est ensuite utilisé, car il représente la dilatation maximale que peut atteindre le cœur de la souris.

V.B.2. Echographie de stress à la dobutamine

La dobutamine est délivrée par voie intrapéritonéale ou intraveineuse à une concentration de 1,5 µg/g. Après l'injection de dobutamine, le rythme cardiaque augmente dans les 2 min, se stabilise à 5 min et reste élevé pour 30 min. La fonction cardiaque est ensuite monitorée par échocardiographie durant la période de stabilisation, les mesures sont ensuite analysées selon le même protocole que l'échographie standard.

V.B.3. Mesure de la relation Pression-Volume

L'analyse volume-pression est réalisée à l'aide d'un système de mesure de volume SciSense Advantage Admittance Derived et de cathéters 1,2 F avec un espacement des électrodes de 4,5 mm (SciSense, London, Ontario, Canada). Les souris sont anesthésiées et ventilées avec 1,5 à 3 % d'isoflurane. La température corporelle sous anesthésie est maintenue à 37 °C. Une incision latérale à travers la peau et les muscles est pratiquée sous la cage thoracique et le diaphragme est coupé afin d'exposer l'apex du cœur. Une petite ponction est pratiquée à l'apex du ventricule gauche à l'aide d'une aiguille 28 G et le cathéter 1,2 F est inséré dans le ventricule gauche. Les paramètres fonctionnels de base sont évalués lors d'une pause de ventilation afin d'éviter les influences respiratoires. Pour les indices indépendants de la charge, y compris les relations pression-volume en fin de systole et de diastole, la veine cave inférieure est temporairement occluse pour faire varier les conditions de pré-charge. L'acquisition et l'analyse des données sont effectuées à l'aide de LabScribe 3 (iWorx, Dover, NH) et l'ajustement de courbe avec MATLAB (MathWorks, Natick, MA). Les données de pression-volume diastoliques sont analysées en utilisant un ajustement mono exponentiel à constante ($P = Ae^{\beta V} + C$) avec l'exposant (β) rapportant pour la rigidité.

VI. Vecteurs Viraux

VI.A. Design des vecteurs

VI.A.1. GFP-luciférase

Les souris sont injectées par le vecteur AAV9-Tnnt2-GFP-luciférase à une dose de $2 \cdot 10^{11}$ vg par souris à l'âge d'un mois et demi. Les mesures de bioluminescence sont ensuite prises après 15 jours d'expression du vecteur, après 1 mois et demi et enfin après 2 mois et demi d'expression, sur des souris alors âgées de 4 mois. Pour les mesures de bioluminescence, les souris sont anesthésiées à l'isoflurane et injectées avec 75 mg/kg de sel de potassium D-Luciférine (Interchim - France) 10 min

avant d'être placées à l'intérieur de l'appareil d'acquisition d'image sur une plaque chauffante à 37 °C. Les images sont acquises en utilisant l'appareil IVIS lumina (Perkin ELMER, USA). Le temps d'exposition est automatiquement réglé par le logiciel d'imagerie (Image vivante) pour assurer une collecte de signal satisfaisante (généralement entre 30 et 120 sec). Les images sont ensuite traitées à l'aide du logiciel Living Image (Perkin ELMER, USA). Une région d'intérêt de balisage manuel est dessinée tout autour de la souris pour attribuer une valeur de flux de photons (photons par seconde ph/s) correspondant à la souris entière.

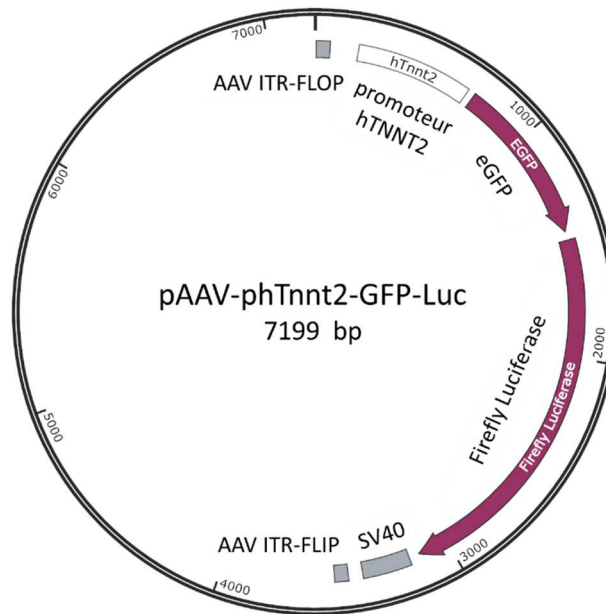


Figure 27 : Plasmide phTnnt2-GFP-Luciférase.

VI.A.2. Candidats

Différents plasmides codant pour les protéines candidates entières ont été construits par clonage à partir de la construction plasmidique GFP-luciférase par la société Genewiz. Après digestion par les enzymes de restriction NruI and XbaI qui flanquent les séquences codantes pour la GFP et la luciférase, le fragment contenant un intron chimérique suivi de la séquence codante du gène a été introduit dans le plasmide. Les séquences codantes choisies sont les séquences humaines suivantes : CILP (NM003613), DKK3 (NM015881), LTBP2 (NM000428.2), SFRP2 (NM003013) et WISP2 (NM003881).

Les constructions plasmidiques shRNA permettant l'inhibition des transgènes ont été commandées chez Vigene Bioscience. Ce sont des constructions comportant 4 séquence de shRNA individuelles, ainsi que le gène rapporteur GFP. Les séquences choisies pour chaque gène sont décrites dans le Tableau 9. Les plasmides sont construits selon le modèle de la Figure 28.

Tableau 9 : Séquences shRNA.

mCILP :	mLTBP2	mWISP2
GCATGTGCCAGGACTTCATGC	GGAAGTCTAGTGACCAGAATA	GCTGTGATGACGGTGGTTTCA
GGTTCCGAGTTCCTGGCTTGT	GCTGGTGAAGGTGCAAATTCA	GCCCAAGGACACCAACTTTCT
GCCTGAAGTCAGCTACCATCA	GCTTCTATGTGGCGCCAAATG	GCCCTTGCTACTCCTGCATCT
GCTGGATCCCTCCCTCTATAA	GCACCAACCACTGTATCAAAC	GCTCATGGAACAGTGCCTTCT

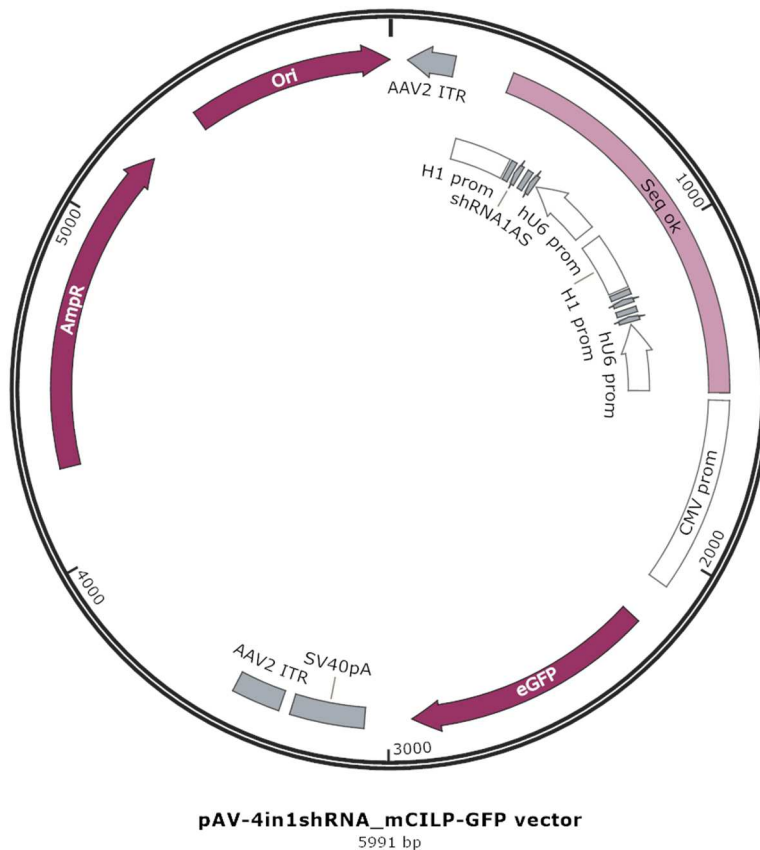


Figure 28 : Carte du plasmide shRNA 4 en 1 mCILP-GFP.

VI.A.3. Nrf2 et micro-ARN

Le vecteur AAV9-tnnt2-mNRF2 a été commandé chez Vectrobiolabs. Il s'agit d'un vecteur viral AAV9, avec un promoteur de troponine cardiaque, portant le transgène murin codant pour Nrf2.

Les vecteur micro ARN ont également été commandés chez Vectrobiolabs. Pour chaque miRNA, le vecteur viral est un scAAV9 (self-complimentary AAV) sous un promoteur EF1a ubiquitaire qui pilote l'expression d'une séquence pre-miRNA murine et du rapporteur eGFP. Un vecteur comportant une séquence pre-miR « scrambled » a également été utilisé comme contrôle.

VI.B. Production des plasmides

Les plasmides sont produits par la transformation de 45 µL de bactérie DH10B avec 2 µL de plasmide. Un choc thermique est effectué par l'alternance de 5 min dans la glace, 30 sec à 42 °C et refroidissement sur glace. Ensuite, 250 µL de milieu SOC (super optimal broth) sont ajoutés avant une incubation à 37 °C pendant 1 h sous agitation. Les bactéries ainsi transformées sont isolées par une culture de 50 µL sur la nuit à 37 °C sur boîte de LB (lysogeny broth) contenant de l'ampicilline afin de sélectionner les bactéries ayant intégré le plasmide. Un clone est repiqué le lendemain pour une préculture de quelques heures à 37 °C dans 3 mL de milieu LB contenant de l'antibiotique. Des échantillons sont gardés pour congélation dans du glycérol à 50 %. Une culture est ensuite réalisée sur la nuit en erlen de 2 L contenant 500 mL de milieu avec antibiotique et 1 mL de la préculture à 37 °C. Un kit NucleoBond PC 2000 EF (Macherey Nagel) est ensuite suivant les instructions du fournisseur pour purifier les plasmides qui sont ensuite stérilisés par une filtration à 0,22 µm et dosés au Nanodrop.

Une digestion enzymatique est réalisée pour vérifier le plasmide avec les enzymes de restriction SMA1 et NHE1. Un mélange contenant 1 µg d'ADN, 2 µL de buffer fast digest green 10X, 1 µl de chaque enzyme en eau stérile pour une quantité totale de 20 µl est agité 20 min à 37 °C. Un gel d'agarose à 1 % en TAE (Tris, Acétate, EDTA) contenant du SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) est coulé avant de déposer les produits de digestions et le marqueur de taille O'GeneRuler™ DNA Ladder mix.

VI.C. Production des vecteurs

La méthode de tri-transfection est utilisée pour préparer les virus recombinants. Les cellules HEK293 sont utilisées comme cellules d'emballage (packaging cells) dans le but de leur faire produire les particules virales. Trois plasmides sont nécessaires : le plasmide-vecteur qui apporte le gène d'intérêt, le plasmide helper (pAAV2-9_Genethon_Kana (Rep2Cap9)), qui apporte les gènes viraux Rep et Cap et le plasmide pXX6 qui contient des gènes adénoviraux et qui remplace la co-infection par un adénovirus, nécessaire à la réplication de l'AAV. Les cellules sont ensuite lysées et les particules virales sont purifiées. Les vecteurs sont produits en suspension.

Ensemencement des cellules (jour 1) : Utilisation des cellules HEK293T clone 17 à confluence, ensemencées dans des flasques d'agitation de 1 litre : 2^5 cellules/mL dans 400 mL de milieu F17 (Thermo Fisher scientific). Incubation sous agitation (100 rpm) à 37 °C – 5 % CO₂ – atmosphère humide.

Matériel et Méthodes

Transfection des cellules (jour 3) : Les cellules sont comptées et la viabilité cellulaire est mesurée sur Vi-CELL après 72 h de culture. Le mix de transfection est préparé dans du tampon Hepès à 10 mg/mL pour chaque plasmide en fonction de sa concentration, de sa taille et de la quantité de cellules dans la flasque, le ratio de chaque plasmide est de 1. Incubation 30 min à RT après l'ajout d'un agent de transfection et l'homogénéisation de la solution. Le mélange de transfection et 3979 µL de milieu de culture (F17 GNT Modified) sont transvasés dans des flasques d'agitation contenant 400 mL de culture qui sont incubées sous agitation (130 rpm) à 37 °C – 5 % CO₂ – atmosphère humide. Après 48 h, traitement des cellules à la benzonase : dilution de benzonase (25 U/mL final) et de MgCl₂ (2 mM final) en milieu F17, ajout de 4 mL par erlen.

Récolte des vecteurs viraux (jour 6) : Les cellules sont comptées et la viabilité cellulaire est mesurée sur Vi-CELL, puis 2 mL de triton X-100 (Sigma, dilution 1/200^{ème}) sont ajoutés avant d'incuber 2 h 30 min à 37 °C, sous agitation. Les erlens sont transférés dans des Corning 500 mL et centrifugés à 2000 g durant 15 min à 4 °C. Les surnageants sont transférés dans des nouveaux Corning 500 mL avant l'ajout de 100 mL de PEG 40 % + NaCl et incubation 4 h à 4 °C. La suspension est centrifugée à 3 500 g durant 30 min à 4 °C. Les culots sont resuspendus dans 20 mL de TMS à pH 8 (Tris HCl à 50 mM, NaCl à 150 mM et MgCl₂ à 2 mM, dilués dans de l'eau) et transvasés dans des Eppendorf 50 mL avant l'ajout de 8 µL de benzonase. Après une incubation de 30 min à 37 °C, les tubes sont centrifugés à 10 000 g durant 15 min à 4 °C.

Purification en gradients de chlorure de césium : Pour la réalisation du gradient, 10 mL de chlorure de césium à la densité 1,3 grammes/mL sont déposés dans des tubes à ultracentrifugation. Un volume de 5 mL de chlorure de césium à la densité 1,5 grammes/mL est ensuite placé en-dessous. Le surnageant est déposé délicatement au-dessus du chlorure de césium et les tubes sont ultracentrifugés à 28 000 RPM pour 24 h à 20 °C. Deux bandes sont observées : la bande supérieure contient les capsides vides et la bande inférieure correspond aux capsides pleines. Les deux bandes sont prélevées en évitant de prélever les impuretés. L'échantillon est mélangé à du chlorure de césium à la densité de 1,379 g/mL, dans un nouveau tube à ultracentrifugation, puis ultracentrifugé à 38 000 RPM, durant 72 h à 20 °C. La bande de capside pleine est prélevée.

Concentration et filtration : L'élimination du chlorure de césium de la préparation virale et la concentration sont effectués sur filtre Amicon® (Merck) par ultrafiltration avec un seuil de coupure de 100 kDa. Les membranes Amicon sont d'abord hydratées avec 14 mL d'éthanol 20 %, centrifugées 2 min à 3000 g, puis équilibrées avec 14 mL de PBS, centrifugées 2 min à 3000 g, puis par 14 mL de chlorure de césium à la densité 1,379 g/mL. La bande de capside pleine prélevée, déposée sur les filtres et centrifugée 4 min à 3000 g. 15 mL de tampon de formulation PBS 1X + F68 sont ajoutés, avant une

nouvelle filtration 2 min à 1500 g. Les trois étapes précédentes sont répétées 6 fois supplémentaires avant de récupérer le dernier concentrât. Les échantillons sont filtrés à 0,22 µm.

Titration : Le vecteur est ensuite dosé par PCR quantitative.

VII. Culture cellulaire

VII.A. Culture

Les cellules utilisées sont la lignée cellulaire de cardiomyocytes murin HL-1 (SCC065, Sigma-Aldrich) (Claycomb et al., 1998). Les cellules sont cultivées selon les recommandations du fournisseur, en milieu Claycomb supplémenté (Sérum de Veau Fœtal 10%, Pénicilline/Streptomycine 100 U/ml:100 µg/ml, Norépinephrine 0,1 mM, L-Glutamine 2 mM).

VII.B. Transfection et transduction des cellules

Les cellules HL-1 sont transfectées avec les différents plasmides selon le protocole de transfection de la Lipofectamine 2000 (ThermoFisher), avec 5 µL de lipofectamine pour 2 µg de plasmide. Pour la transfection, les cellules sont cultivées en plaque 12 puits et sont utilisées une fois qu'elles sont arrivées à 80 % de confluence. L'ADN et la lipofectamine sont chacun dilués dans 100 µL d'Opti-MEM I reduced medium et incubés 5 min. Ils sont ensuite combinés et incubés 20 min à température ambiante avant d'être mis en culture en plaque 12 puits dans 0,8 mL de milieu de culture Claycomb (sans Pénicilline/Streptomycine, ni Norépinephrine) et incubés à 37 °C en incubateur CO₂. Après 18 h, 1 mL de milieu est rajouté. Le milieu est entièrement changé après 24 h. Les transfections sont arrêtées après 72 h.

Pour les essais de transduction, les cellules sont portées à confluence sur une plaque 24 puits. Les cellules HL-1 sont ensuite infectées par les vecteurs AAVs à une dose de $4 \cdot 10^{11}$ vg par puit.

VII.C. Marquage par immuno-fluorescence

Les cellules sont fixées après un rinçage en PBS par incubation en Formaline 4 % pendant 20 min à température ambiante, puis rincées 2 fois en PBS. Elles sont ensuite perméabilisées par un traitement au triton 100X 0,5 % pendant 5 min à température ambiante. Les étapes de blocage et de marquage par les anticorps primaires sont les mêmes que celles décrites pour l'immuno-histo fluorescence.

Tableau 10 : Liste des anticorps utilisés en immunofluorescence.

Anticorps	Espèce	Fournisseur	Référence	Dilution
<i>GFP</i>	Lapin	Abcam	ab6556	1/1000
<i>CILP</i>	Lapin	biorbyt	orb182643	1/100

VIII. Statistiques

Dans toutes les analyses statistiques, les différences sont considérées significatives à $P < 0,05$ (*), moyennement significatives à $P < 0,01$ (**) et hautement significatives à $P < 0,001$ (***), avec P = probabilité. Les graphiques en barres sont représentés en moyennes + SEM écarts-types. Les graphiques sont réalisés à l'aide du logiciel GraphPad.

Analyse de la répartition de la fibrose sur le cœur entier : Afin de s'assurer que la fibrose est homogène dans le cœur (hypothèse H_0), nous avons pioché aléatoirement 20 valeurs dans les 483 valeurs de ratio de fibroses. Ces valeurs ont été comparées 10 à 10 avec un test de Wilcoxon (Logiciel R) afin d'obtenir une p-value. Cette opération a été répétée 1000 fois, ce qui a permis d'obtenir 1000 p-values. Parmi ces valeurs certaines sont en dessous de 0,05 montrant que dans certains cas notre hypothèse d'invariance de la fibrose n'est pas valide. Sur les 1000 test statistiques, nous avons compté combien donnaient une valeur inférieure à 0,05. Nous avons répété la totalité du processus 100 fois afin d'obtenir une moyenne du pourcentage pour lequel notre hypothèse H_0 est fautive. Cette moyenne est de 4 %. Cela signifie que notre hypothèse est valable 96 % du temps, et correspond donc à une p-value globale de 0,04, acceptable statistiquement.

Analyses échographiques : Afin de déterminer quels sont les liens entre les paramètres et quels sont les paramètres d'intérêt pour l'étude, le logiciel statistique R est utilisé. La fonction *scatterplotMatrix* a permis de visualiser les corrélations entre les mesures à différents âges et de sélectionner les paramètres à étudier. Les analyses statistiques sont réalisées avec *Rcmdr* et les graphiques à l'aide du logiciel GraphPad.

RESULTATS

I. Première partie : Caractérisation du modèle DeltaMex5

Cette première partie présente la caractérisation du modèle murin DeltaMex5. Des observations histologiques initiales avaient révélé une atteinte cardiaque chez ce modèle (Charton et al., 2016). Nous avons voulu définir cette atteinte plus en détails et compléter la caractérisation de l'atteinte musculaire afin de déterminer plus précisément les conséquences de la délétion de l'exon Mex5 sur le phénotype de la souris. Ces analyses ont été réalisées aux niveaux morphologique, fonctionnel et moléculaire.

I.A. Caractérisation morphologique

La caractérisation de l'atteinte morphologique des tissus musculaires squelettique et cardiaque des souris DeltaMex5 a été effectuée par une observation générale des masses des souris et des différents muscles, des analyses histologiques permettant en particulier une analyse de l'état fibrotique, une analyse du tissu en microscopie à feuille de lumière ainsi que des analyses en microscopie électronique.

I.A.1. Observations générales

La masse des souris a été suivie au cours du temps. Lors des prélèvements, la masse de différents muscles a également été mesurée. La masse des souris augmente avec l'âge, et a tendance à être supérieure chez les souris DeltaMex5, elle atteint des valeurs significativement supérieures uniquement à 1 mois (DeltaMex5 : $22,69 \pm 0,43$ g versus C57BL/6 : $15 \pm 0,88$ g, $P < 0,001$). La masse des muscles augmente avec l'âge mais reste équivalente dans les deux modèles. Cette évolution est observée pour le diaphragme, le muscle tibial antérieur et le soléaire, et le constat reste le même

Résultats

lorsque les masses des muscles sont normalisées par rapport à la masse totale de la souris (Figure 29

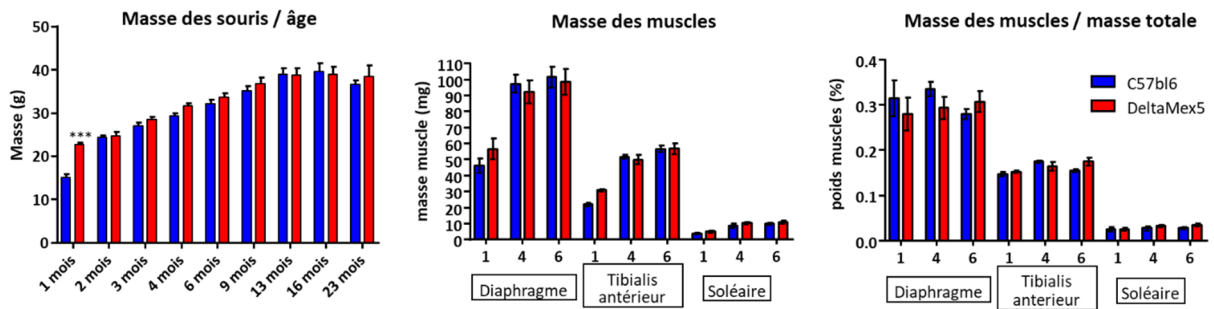


Figure 29). Il est à noter que les souris au prélèvement montrent une quantité de graisse plus importante au niveau abdominal, mais également répartie au reste du corps. Il est à noter également que les muscles DeltaMex5 semblaient moins attachés aux fascias que les muscles des souris C57BL/6.

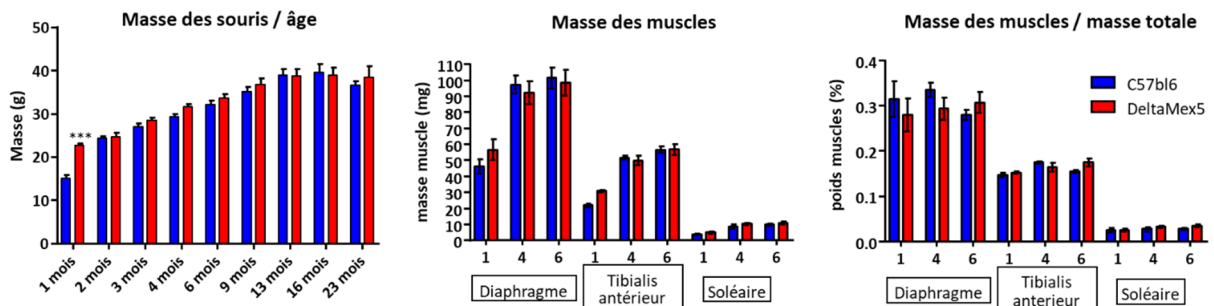


Figure 29 : Mesure de la masse des souris en fonction de l'âge.

Mesure de la masse des muscles (diaphragme, tibialis antérieur, soléaire) en fonction de l'âge. Normalisation de la masse des muscles en fonction de la masse totale de la souris. n entre 4 et 8. Test ANOVA.

La masse du cœur a également été mesurée et ne montre pas d'augmentation significative par rapport aux souris C57BL/6, quel que soit l'âge (Figure 30) bien qu'une tendance à l'hypertrophie du cœur des souris DeltaMex5 puisse être observée. Cette tendance est lissée lorsque la masse du cœur est normalisée par rapport à la masse totale de la souris.

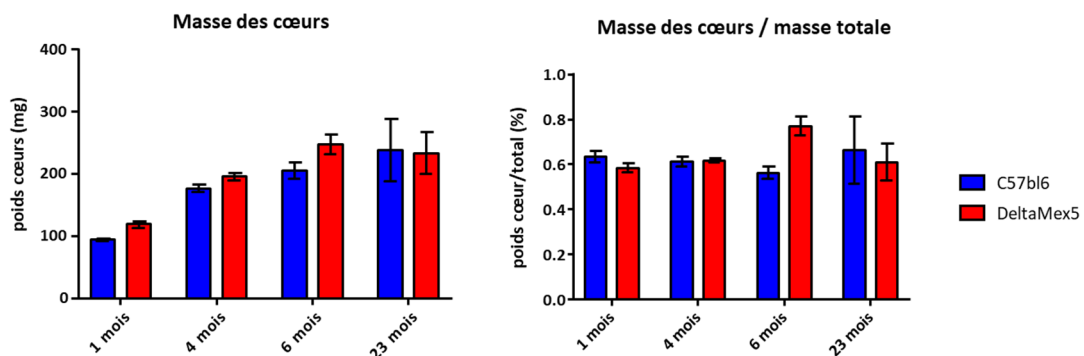


Figure 30 : Mesure de la masse du cœur en fonction de l'âge et normalisation de la masse du cœur en fonction de la masse totale de la souris.

n entre 4 et 8. Test ANOVA.

I.A.2. Caractérisation histologique

I.A.2.a. Caractérisation histologique du tissu musculaire squelettique

Des marquages histologiques des muscles ont été réalisés. Les coupes ont été marquées par une coloration à l'Hématoxyline Phloxine Safran (HPS) afin d'observer l'état général du tissu musculaire et par une coloration au Rouge Sirius. Ce colorant acide hydrophile met en évidence la fibrose en se fixant sur les groupements basiques des différentes fibres de collagène. Les muscles étudiés sont le muscle soléaire et le tibial antérieur (TA). Ils possèdent des caractéristiques métaboliques différentes chez la souris : le muscle soléaire est composé presque exclusivement de fibres de type I et le tibial antérieur à l'inverse est composé de fibres de type II. De façon intéressante, leur ratio d'isoformes de la Titine est également différent : le muscle soléaire contient majoritairement de la titine exprimant l'exon Mex5, tandis que le TA exprime les deux isoformes avec et sans l'exon Mex5 (Charton et al., 2016).

Le muscle soléaire présente de nombreuses fibres avec un noyau central, indiquant la mise en place de cycles de dégénération/régénération du muscle (Figure 31A). L'indice de centronucléation dans les soléaires à 4 et 6 mois est significativement supérieur chez les souris DeltaMex5 comparé aux souris contrôles (DeltaMex5 : 2994 ± 536 versus C57BL/6 : $34,57 \pm 5,69$, $P < 0,0001$, $n=7$; $3286 \pm 692,3$ versus $44,67 \pm 12,77$, $P=0,0002$, $n=3$). En revanche, il n'y a pas d'augmentation du nombre de noyaux centraux dans le tibial antérieur (DeltaMex5 : $70,67 \pm 26,77$ versus C57BL/6 : $99 \pm 18,77$, $P > 0,05$, $n=3$; $236 \pm 85,77$ versus $122 \pm 34,43$, $P > 0,05$, $n=3$) (Figure 31C). Le muscle soléaire des souris DeltaMex5 apparaît très fibrotique (Figure 31B). La quantification du Rouge Sirius dans les soléaires à 4 et 6 mois par Sirius Quant, une macro développée en interne sur Image J comparant la proportion de tissu sain à la proportion de collagène marqué en Rouge Sirius, confirme que l'indice de fibrose est significativement supérieur chez les souris DeltaMex5 comparé aux souris contrôles (DeltaMex5 : 26 ± 2 versus C57BL/6 : $15 \pm 1,1$, $P=0,002$; $23,5 \pm 1,5$ versus $15 \pm 1,1$, $P=0,017$, $n=4$) (Figure 3D). En conclusion, ces observations montrent que l'atteinte musculaire est importante dans le soléaire mais est limitée dans le tibial antérieur.

Résultats

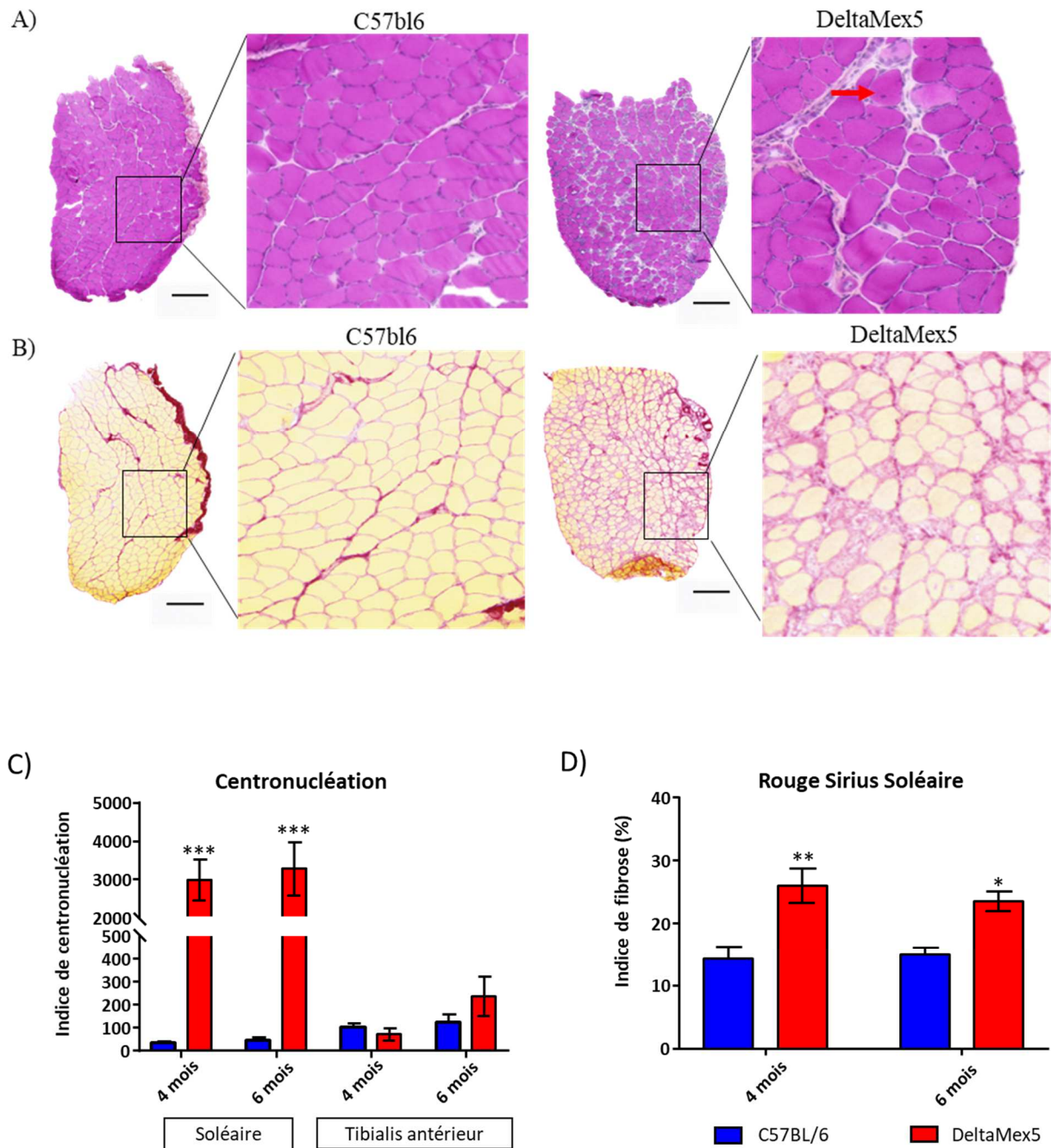


Figure 31 : Caractérisation histologique musculaire.

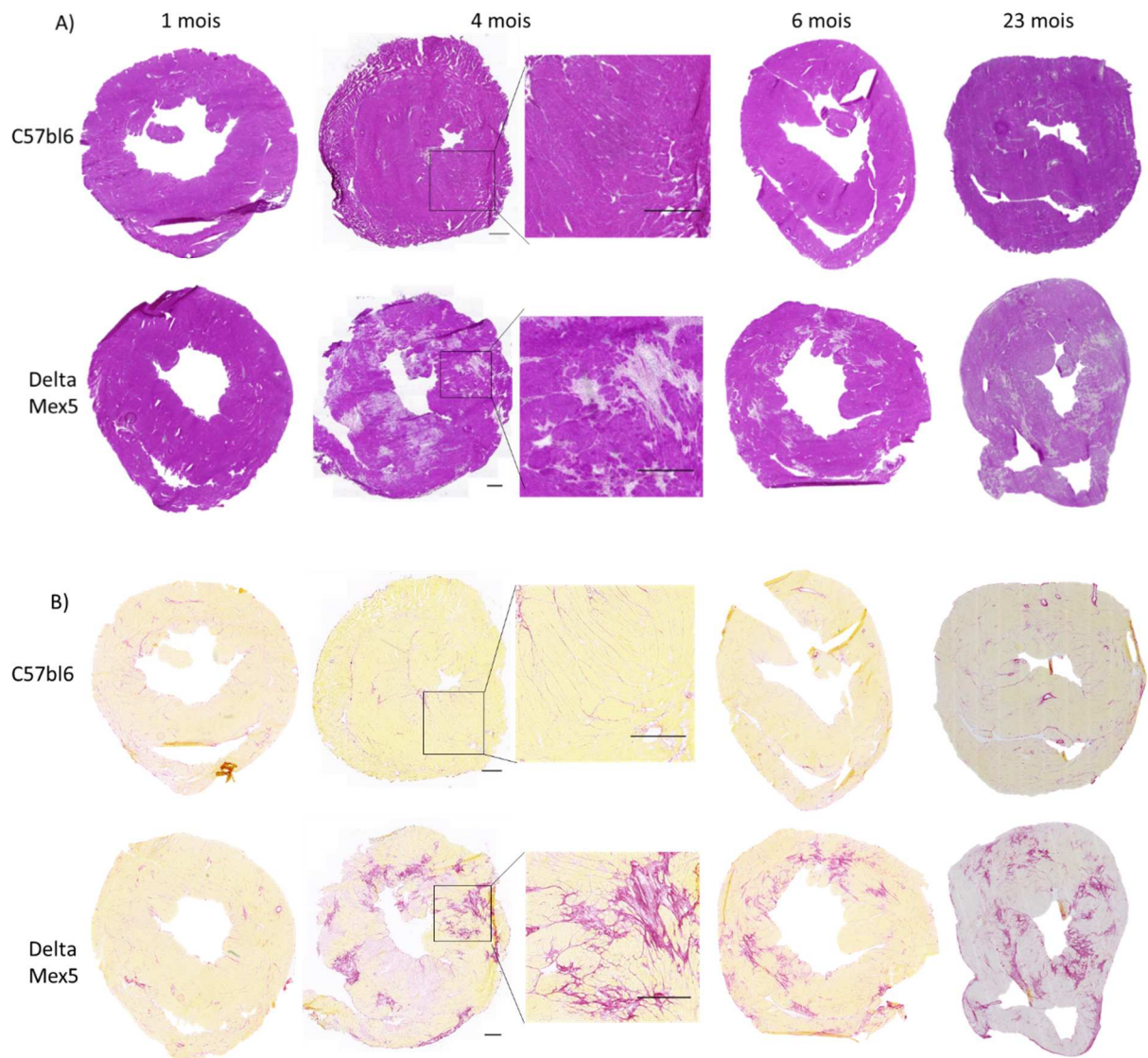
A) Coloration en HPS des soléaires de souris DeltaMex5 et C57BL/6 à 4 mois. Flèche rouge : centronucléation. B) Coloration en Rouge Sirius des soléaires de souris DeltaMex5 et C57BL/6 à 4 mois. Echelle, 500 μm. C) Quantification de la centronucléation dans les muscles soléaires et tibialis antérieur à 4 et 6 mois. D) Quantification de la coloration en Rouge Sirius dans les muscles soléaires à 4 et 6 mois. Test ANOVA.

I.A.2.b. Caractérisation histologique du tissu cardiaque

Des coupes de cœurs de souris à différents âges (1, 4, 6 et 23 mois) ont été colorées par HPS et Rouge Sirius pour évaluer l'impact histologique de la délétion de l'exon Mex5. La coloration HPS révèle une pathologie cardiaque avancée dès 4 mois, visible par les larges aires de tissu abimé chez les souris DeltaMex5 comparé aux tissus sains des souris contrôles (Figure 32A). La coloration au Rouge

Résultats

Sirius démontre la présence de tissu fibrotique dans le cœur des souris DeltaMex5 à 4 mois réparti sur toute la coupe (Figure 32B). La quantification du Rouge Sirius dans le cœur a été effectuée par Sirius Quant (Figure 35C) et montre que dès 4 mois la proportion de collagène dans le cœur des souris DeltaMex5 est significativement élevée (DeltaMex5 : $10,69 \pm 1,17$ % versus C57BL/6 : $3,69 \pm 1,21$ %, $P=0,0001$, $n=4$). A 6 mois, la proportion de collagène dans le cœur des souris DeltaMex5 est encore augmentée de 3 % supplémentaires (DeltaMex5 : $13,27 \pm 1,26$ % versus C57BL/6 : $3,84 \pm 0,16$ %, $P<0,0001$, $n=4$). Cependant à un âge tardif, à 23 mois, la proportion de collagène n'est augmentée que de 2 % par rapport aux souris plus jeunes (DeltaMex5 : $15,20 \pm 0,5$ % versus C57BL/6 : $5 \pm 0,41$ %, $P<0,0001$, $n=4$), marquant une absence de la progression de la fibrose cardiaque après un certain point.



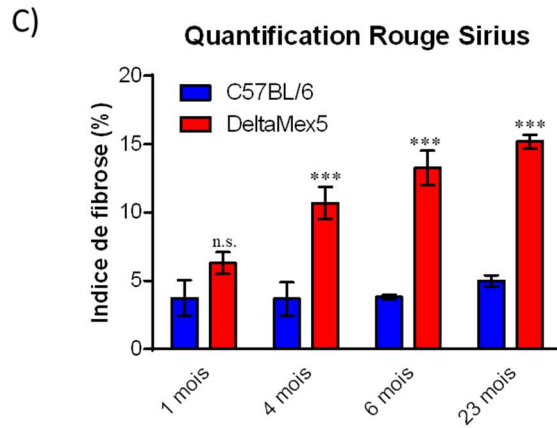


Figure 32 : Caractérisation histologique du cœur.

A) Coloration en HPS du cœur des souris DeltaMex5 et C57BL/6 à 4 mois. B) Coloration en Rouge Sirius du cœur des souris DeltaMex5 et C57BL/6 à 4 mois. Echelle, 500 μ m. C) Quantification de la coloration en Rouge Sirius dans le cœur aux différents âges. Test ANOVA.

Pour évaluer la répartition de la fibrose dans la totalité du cœur et pour déterminer si une seule coupe au centre du cœur était suffisamment représentative, nous avons également coupé et coloré en Rouge Sirius un cœur en 600 tranches de l'apex aux oreillettes. Les indices de fibrose ont été quantifiés pour chaque coupe sur les 2/3 centraux (Figure 33). La comparaison aléatoire de valeurs 10 à 10 répétée 1000 fois a permis d'obtenir 1000 valeurs *P* différentes à l'aide d'un test de Wilcoxon, avec un pourcentage d'erreur moyen qui est inférieur à 5 %. Sur les 2/3 centraux du cœur, la fibrose est uniformément répartie dans le sens transversal, nous permettant de considérer une unique coupe centrale comme représentative.

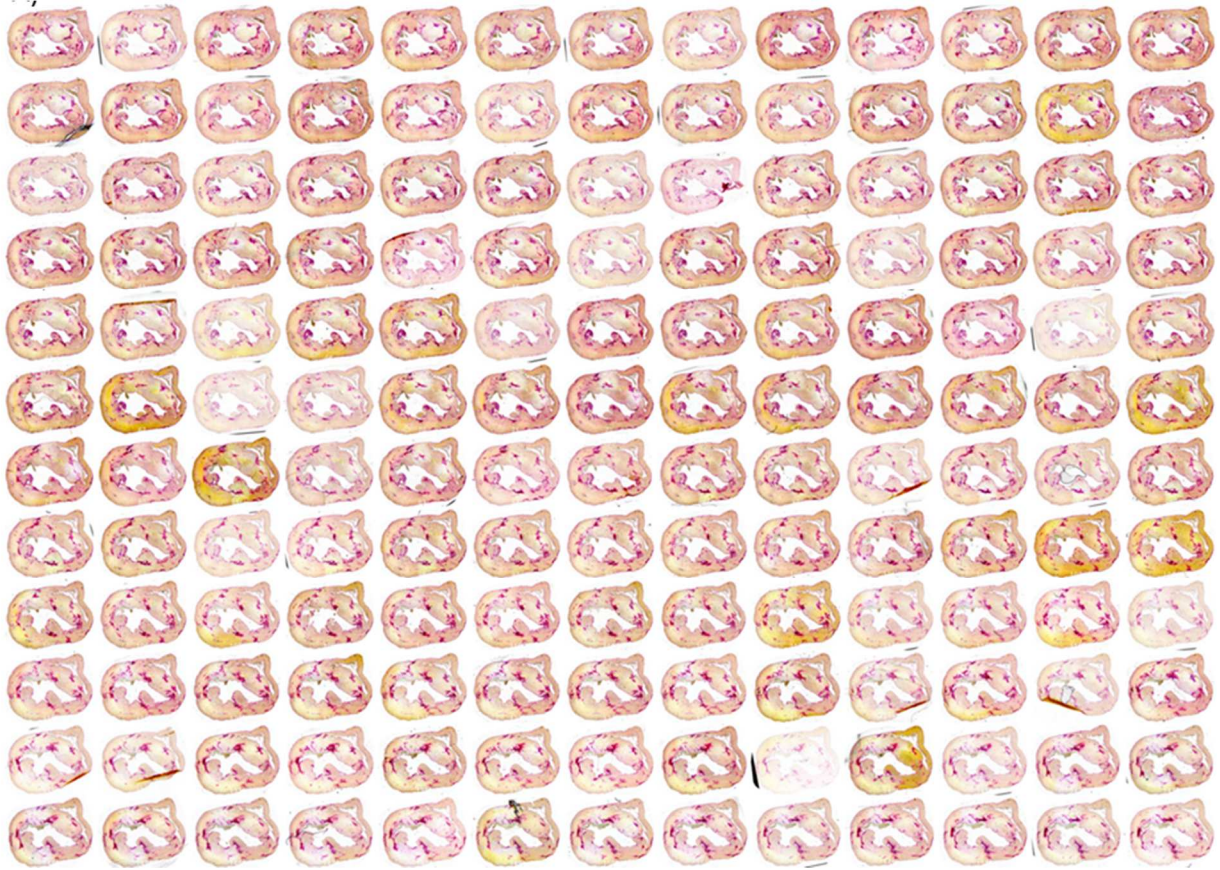


Figure 33 : Répartition de la fibrose dans le cœur des souris DeltaMex5.
Exemple de coupes de cœur à différentes positions.

I.A.3. Caractérisation des différences observées dans la fibrose

I.A.3.a. Quantification de la fibrose par WEKA

L'observation du marquage Rouge Sirius en lumière directe a révélé qu'il existait une troisième zone différenciellement colorée en plus des cytoplasmes colorés en jaune par la solution de Bouin, un des composants de la solution de marquage Rouge Sirius et des fibres de collagène colorées en rouge par la composante Rouge Sirius de la solution. Cette zone qui n'est pas quantifiée par la technique du Sirius Quant présente une coloration rose, pouvant suggérer une prise réduite de la coloration Rouge Sirius (Figure 34A,B). Une autre méthode de quantification du marquage a donc été développée pour différencier ces trois types de marquages utilisant un algorithme d'intelligence artificielle via le plugin WEKA (ImageJ).

Résultats

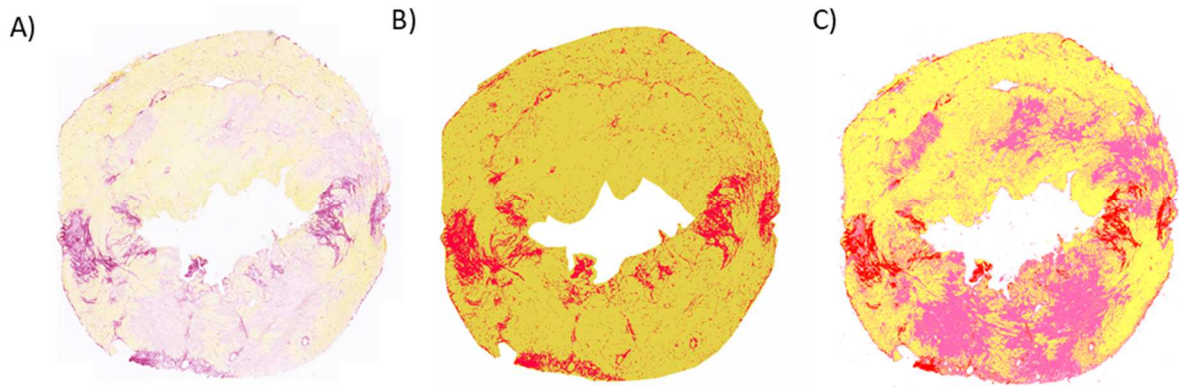


Figure 34 : Différentes techniques de quantification du Rouge Sirius.

A) Coloration au Rouge Sirius d'un cœur de souris DeltaMex5 à 4 mois. B) Aire rouge détectée par Sirius Quant. C) Aires rouges et roses détectées par WEKA.

La quantification par WEKA permet de différencier les différents types de coloration (Figure 34A,C). Le plugin classificateur WEKA est implémenté à l'aide d'un ensemble de données d'apprentissage contenant une quinzaine d'images représentatives des différentes conditions à classer. Les classes sont attribuées par l'expérimentateur aux trois zones de coloration afin d'entraîner le logiciel à les différencier (Figure 35A et B). Un fois le classificateur entraîné sur les données d'apprentissage, il est appliqué sur les coupes entières.

La surface totale de tissu marqué (prise complète et partielle du Rouge Sirius) par le colorant est significativement supérieure chez les souris DeltaMex5 à 4 et 6 mois en comparaison avec les souris contrôle (DeltaMex5 : $12,51 \pm 1,10$ versus C57BL/6 : $8,77 \pm 0,97$, $P > 0,05$; $20,75 \pm 0,87$ versus $7,57 \pm 1,49$, $P < 0,0001$; $19,71 \pm 2,47$ versus $10,38 \pm 0,55$, $P < 0,0001$, $n=4$) (Figure 34C). La surface des zones ayant une faible prise du colorant (coloration rose) est également supérieure à tous les âges, mais significativement uniquement à 4 mois (DeltaMex5 : $9,92 \pm 0,78$ versus C57BL/6 : $7,10 \pm 0,78$, $P < 0,05$; $14,22 \pm 1,90$ versus $4,40 \pm 0,72$, $P < 0,0001$; $11,38 \pm 1,40$ versus $7,74 \pm 0,39$, $P < 0,05$). En revanche, la surface de zones ayant une forte prise du colorant (coloration rouge) n'est significativement supérieure qu'à 6 mois (DeltaMex5 : $2,59 \pm 0,36$ versus C57BL/6 : $1,68 \pm 0,23$, $P > 0,05$; $6,53 \pm 1,15$ versus $3,17 \pm 1,61$, $P > 0,05$; $8,33 \pm 1,44$ versus $2,64 \pm 0,25$, $P = 0,015$). A cet âge, la surface de faible prise a diminué en faveur de la forte prise.

Résultats

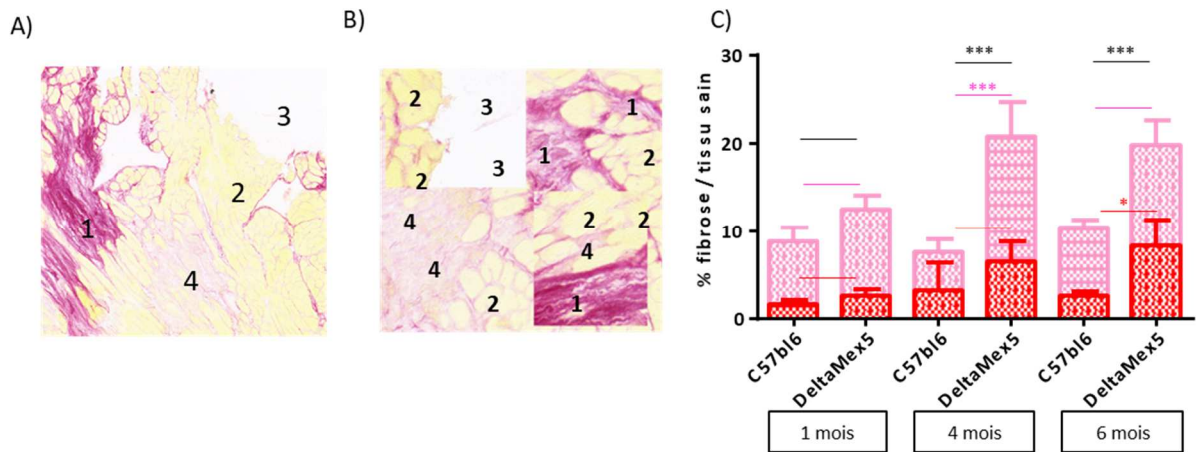


Figure 35 : Quantification de la coloration au Rouge Sirius par WEKA.

A) Identification des aires : 1 = coloration rouge, 2 = tissu sain, 3 = extérieur, 4 = coloration rose. B) Entraînement sur plusieurs coupes. C) Quantification des deux prises de coloration chez les souris DeltaMex5 et C57BL/6. Test ANOVA.

I.A.3.b. Caractérisation de la fibrose

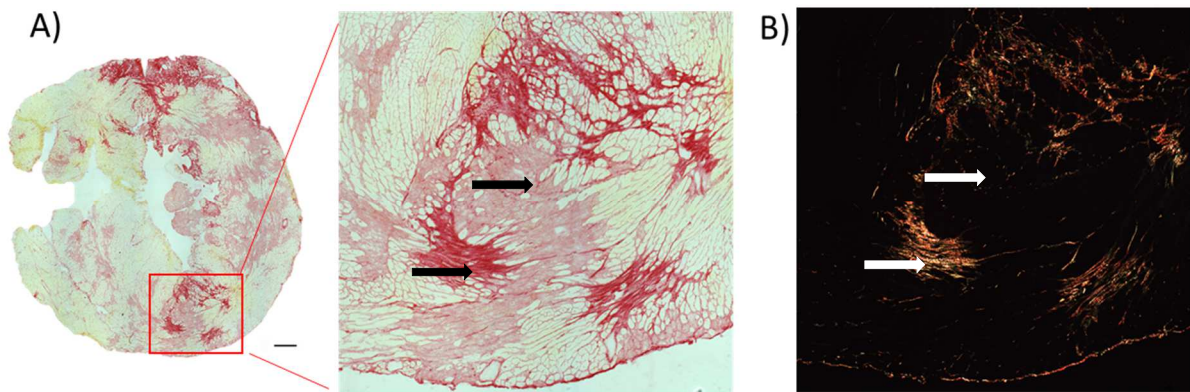


Figure 36 : Observation du Rouge Sirius.

A) Coloration Rouge Sirius observée en lumière droite. B) Coloration Rouge Sirius observée en lumière polarisée. Echelle, 500 µm.

Nous avons ensuite voulu caractériser la raison de cette prise différentielle. En lumière directe, le Rouge Sirius colore le collagène en rouge. Il peut également être observé en lumière polarisée : les fibres de collagène sont biréfringentes et apparaissent alors sous forme d'une coloration lumineuse quand le reste du tissu reste sombre. L'observation d'une même zone de coupe contenant de les deux types de prise de la coloration par lumière directe (Figure 36A) et en lumière polarisée (Figure 36B) révèle que seules les zones avec une prise complète du Rouge Sirius sont biréfringentes. Ainsi, la prise partielle de la coloration ne semble pas, à première vue, présenter de fibres de collagène matures. Cependant, cette coloration partielle équivaut bien à du tissu lésé, comme montré par la coloration HPS. Les deux colorations diffèrent par la quantité de noyaux, qui sont bien moins abondants dans les parties avec une prise complète du Rouge Sirius (Figure 37B).

Résultats

Afin d'identifier la nature des zones différemment colorées, un immuno-marquage des protéines spécifiques des fibroblastes et de la fibrose a été effectué. Les fibroblastes secrètent dans la matrice extracellulaire la fibronectine, les collagènes I et III, ainsi que la vimentine une protéine uniquement présente dans les fibroblastes mais pas dans les cardiomyocytes. Lorsque les fibroblastes se différencient en proto-myofibroblastes, ils commencent à exprimer l'actine F filamenteuse et augmentent la sécrétion de matrice extracellulaire. Enfin, lorsqu'ils atteignent le stade myofibroblastes, les cellules expriment également l'actine alpha du muscle lisse et la vinculine, une protéine membranaire et cytosquelettique présente notamment au niveau des plaques d'adhésion focale. Le marquage de la fibronectine (Figure 37E) est présent dans tout le tissu lésé. Le marquage du collagène I et de la vimentine (Figure 37C et F), est spécifique des zones abimées et montre deux types de marquage : dans les zones à prise complète du Rouge Sirius, sous forme de fibres et dans les zones à prise partielle, sous une forme intracellulaire plus compacte. Le marquage du collagène III (Figure 37D) n'est présent que sous forme de fibres dans les zones à prise complète du Rouge Sirius. Le marquage de l'actine F (Figure 37H) n'est présent que dans la zone à prise partielle, ainsi que la marquage de la vinculine que l'on retrouve cependant en faible intensité dans la zone à prise complète (Figure 37G).

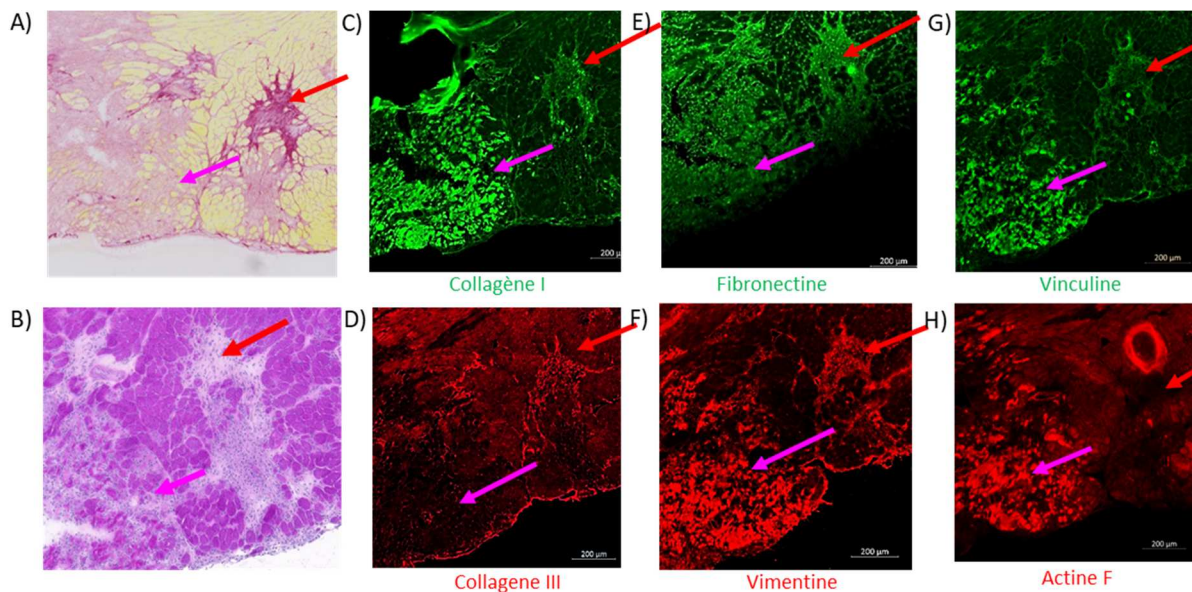


Figure 37 : Caractérisation de la fibrose.

A) Coloration Rouge Sirius. B) Coloration HPS. Marquage par Immuno-histofluorescence C) du Collagène de type I, D) du Collagène de type III, E) de la Fibronectine, F) de la Vimentine, G) de la Vinculine et H) de l'Actine F. Flèche rose = zone colorée en rose, flèche rouge = zone colorée en rouge au Rouge Sirius. Echelle, 200 µm.

Ainsi, il semble que la différence de prise de coloration en Rouge Sirius observée sur les cœurs reflète deux étapes dans la formation de la fibrose. Les protéines de la matrice extracellulaire sont présentes majoritairement sous la forme intracellulaire, avant leur sécrétion, dans les zones à prise partielle du Rouge Sirius, et uniquement sous la forme extracellulaire, sécrétée, dans les zones à prise

complète de la coloration. Ceci explique l'absence de visualisation de la biréfringence dans la zone à prise partielle, le collagène n'est pas encore présent sous la forme de fibre. Les protéines marquant les myofibroblastes sont présentes dans la zone à prise partielle du colorant, mais quasiment absentes dans la zone à prise complète. La présence des protéines caractéristiques des myofibroblastes et l'abondance de noyaux dans la zone à prise partielle indique que la différenciation des fibroblastes a eu lieu. Les cardiomyocytes ont été remplacés par les myofibroblastes en grande quantité et produisent les protéines de la matrice extracellulaire responsables de la fibrose, formant une fibrose intermédiaire. En revanche, la quasi absence des protéines myofibroblastiques dans la zone à prise complète du Rouge Sirius, appuyé par la diminution du nombre de noyaux, donc de cellules, et la présence des protéines secrétées de la MEC en grande quantité, laisse penser que cette zone est une fibrose plus installée, composée essentiellement de la MEC après le départ des myofibroblastes. Ces résultats sont corrélés avec l'augmentation des zones à prise complète avec l'âge au dépend des zones à prise partielle, donc de la fibrose installée qui remplace la fibrose intermédiaire.

1.A.4. Caractérisation par Imagerie à feuille de lumière

La technologie de microscopie à feuille de lumière consiste à visualiser uniquement une fine tranche d'un échantillon, et permet d'imager dans son intégralité un tissu sans qu'il soit nécessaire de le couper. Le tissu peut être préalablement marqué par un anticorps dirigé contre la protéine d'étude puis rendu complètement transparent en ôtant les lipides membranaires par la méthode du iDISCO (Renier et al., 2014) afin que la feuille de lumière puisse passer à travers. La fusion des images obtenues par le scan intégral du tissu permet ensuite la reconstitution tridimensionnelle de l'échantillon en imagerie (Figure 38).

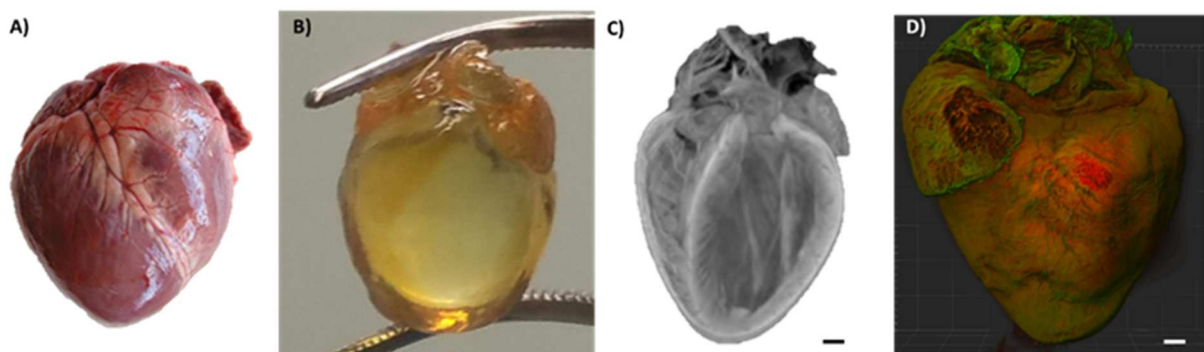


Figure 38 : Imagerie du cœur par microscopie à feuille de lumière.

A) Cœur de souris. B) Cœur de souris rendu transparent après traitement iDISCO. C) Observation du cœur par microscopie à feuille de lumière D) Reconstitution 3D du cœur. Echelle, 500 µm.

Nous avons voulu utiliser cette technologie pour observer la structure du cœur dans notre modèle par marquage de la dystrophine, de la connexine 43 et de l'obscurine, mais également pour

Résultats

observer la fibrose par un marquage de la fibronectine ou du collagène. Le marquage de la dystrophine, une protéine membranaire, et de la connexine 43, une protéine de jonction, permettent l'observation de la structure des cardiomyocytes en 3D (Figure 39). Cependant, la pénétration des anticorps dans le tissu n'est pas suffisante et malgré plusieurs essais nous n'avons pas réussi à nous affranchir de cet « effet coque » comme observé sur la Figure 40A : le marquage des tissus reste en périphérie et n'atteint pas le centre du tissu, les marquages n'ont donc pas pu être utilisés pour l'étude.

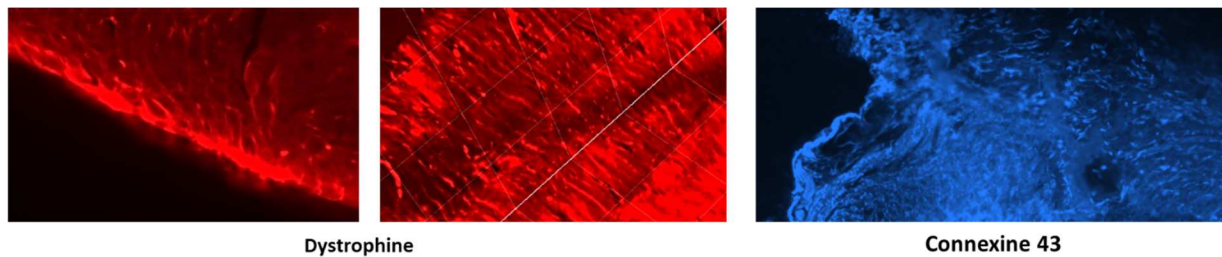
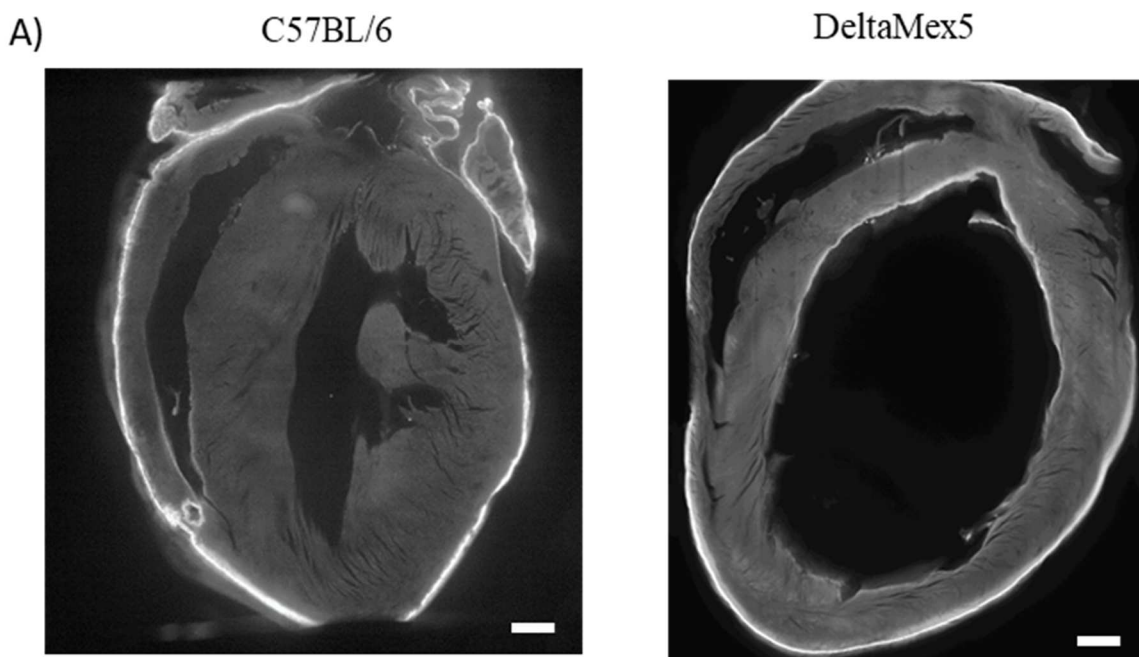


Figure 39 : Exemples de marquage de cœur observés par imagerie à feuille de lumière, marquages de la dystrophine et de la connexine 43.

Néanmoins, l'observation du cœur des souris DeltaMex5 et C57BL/6 par imagerie à feuille de lumière a pu être utilisée pour quantifier le volume total occupé par les ventricules dans le cœur en comparaison du tissu et ainsi nous fournir une mesure physique de la dilatation cardiaque (Figure 40A). Le cœur des souris DeltaMex5 à 4 mois a une taille significativement supérieure à celle des souris C57BL/6 ($165,9 \pm 10,47 \text{ mm}^3$, $n=8$, versus $116,1 \pm 7,52 \text{ mm}^3$, $n=4$; $P=0,002$), et le volume occupé par les ventricules est significativement plus important ($36,28 \pm 1,913 \text{ mm}^3$, $n=8$, versus $21,50 \pm 1,67 \text{ mm}^3$, $n=4$; $P=0,002$) (Figure 40B). Le cœur des souris DeltaMex5 à 4 mois présente une dilatation des ventricules, notamment du ventricule gauche.



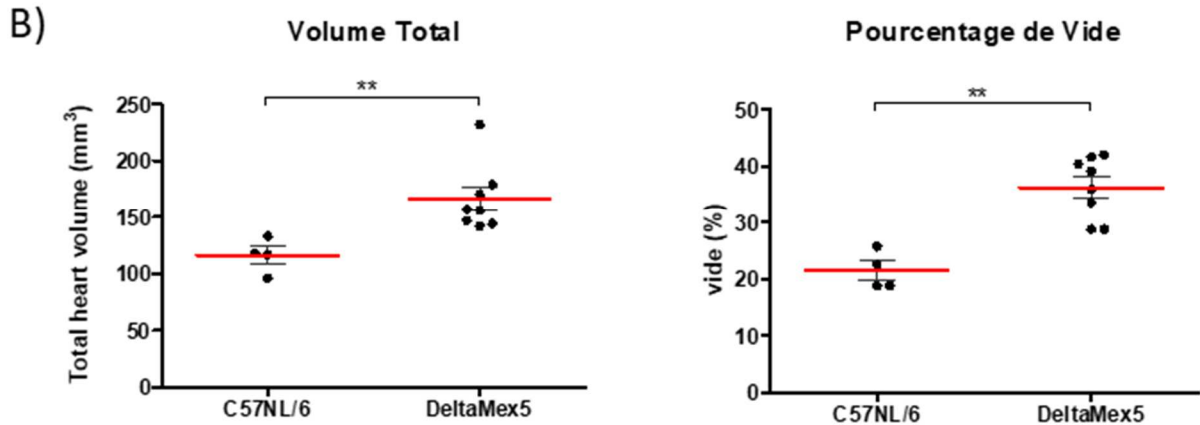


Figure 40 : Quantification du volume ventriculaire par microscopie à feuille de lumière.

A) Cœurs de souris C57BL/6 et DeltaMex5 à 4 mois. B) Quantification du volume total du cœur et du pourcentage de volume vide. Test de Mann-Whitney.

1.A.5. Caractérisation en microscopie électronique

1.A.5.a. Caractérisation en microscopie électronique du tissu musculaire squelettique

La microscopie électronique en transmission est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons est transmis à travers un échantillon. L'interaction des électrons avec l'échantillon préalablement traité avec du citrate de plomb pour augmenter les contrastes permet l'obtention d'images à grande résolution. La microscopie électronique en transmission a permis l'étude du muscle soléaire à 4 mois et de la structure de différents composants de la fibre musculaire tels que les tubules T, les sarcomères, les noyaux et les mitochondries (Figure 41A et B). Les observations montrent que de nombreuses fibres musculaires sont préservées et qu'une proportion relative de fibres présentent de larges anomalies dans le modèle DelMex5 (flèche jaune). Les sarcomères ne sont pas homogènes, certains sont intacts tandis que d'autres sont plus irréguliers (flèche noire), et certaines triades sont dilatées (flèches vertes). La présence de noyaux centraux et de fibrose est également observée uniquement dans les muscles DeltaMex5 (flèches blanche et rouge). Un important dommage des mitochondries est constaté, avec des mitochondries altérées et la présence de nombreuses vacuoles autophagiques et non autophagiques (flèches rose et bleues). Les vacuoles sont également retrouvées dans les muscles des souris contrôle mais en plus petit nombre.

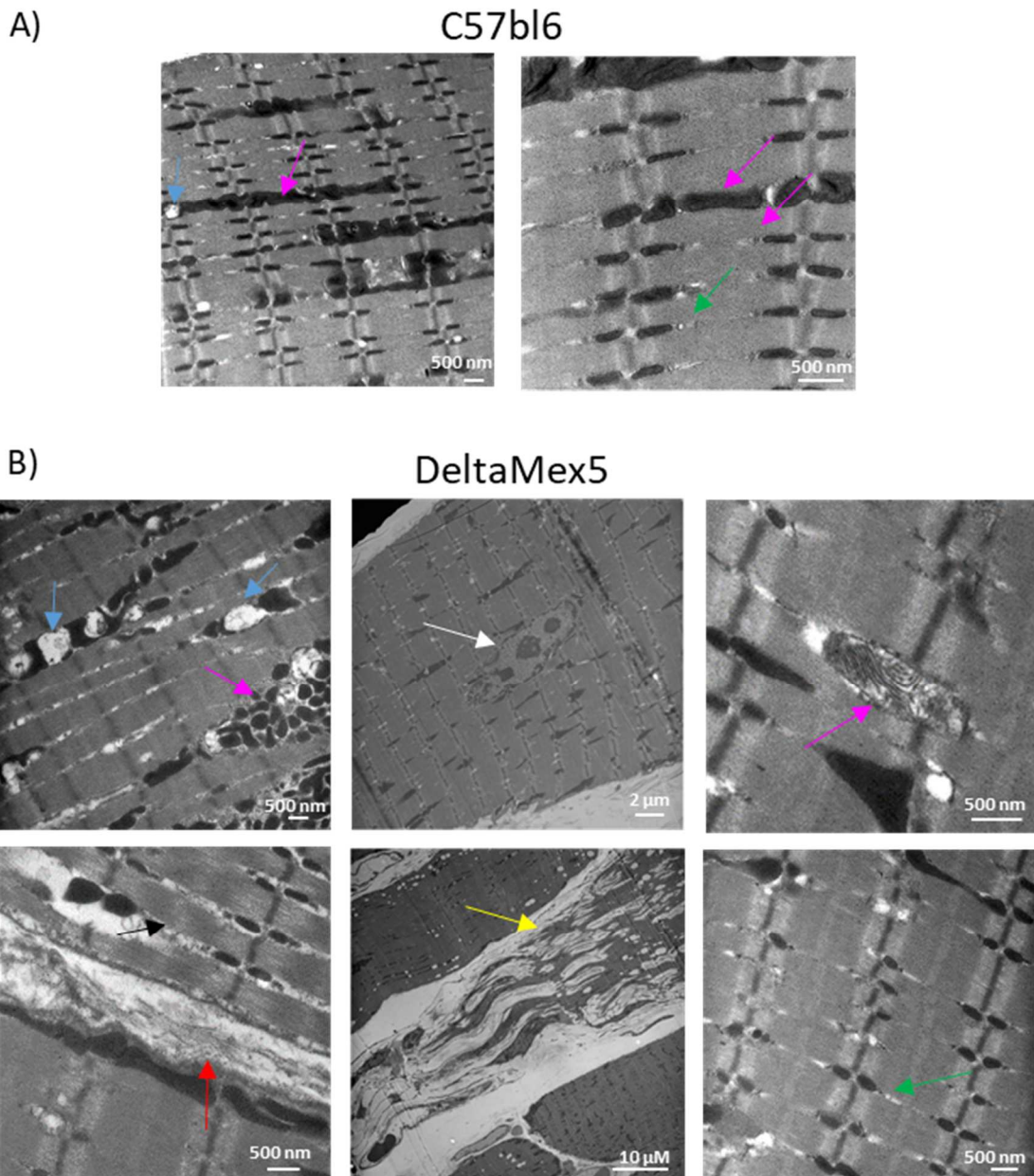


Figure 41 : Observation du muscle soléaire en microscopie électronique.

A) Muscle Soléaire d'une souris C57BL/6 de 4 mois. B) Muscle soléaire d'une souris DeltaMex5 de 4 mois. Flèches : jaune = fibre abimée, noire = sarcomère irrégulier, vert = triade, blanc = noyau central, rouge = fibrose, rose = mitochondries, bleue = vacuoles.

I.A.5.b. Caractérisation en microscopie électronique du tissu musculaire cardiaque

La microscopie électronique a également été utilisée sur les muscles papillaires des souris pour identifier les changements microscopiques dus à la délétion de l'exon Mex5 au niveau du tissu musculaire cardiaque. Les muscles papillaires sont des cônes musculaires saillants à la surface de la paroi des ventricules cardiaques. Ils sont le lieu d'insertion des cordages des valves atrio-ventriculaires. Leur forme facilite le prélèvement et l'obtention de tissus fins bien conservés pour l'étude microscopique.

Résultats

L'observation en microscopie électronique des papillaires de souris C57BL/6 et DeltaMex5 (Figure 42A et B) révèle la présence de sarcomères altérés avec des bandes A et I qui apparaissent moins définies (flèche noire). La présence de fibrose et de cellules inflammatoires est également observée (flèches rouge et jaune). Les mitochondries semblent aussi affectées et de nombreuses vacuoles autophagiques et non autophagiques sont retrouvées dans le cœur DeltaMex5, en nombre supérieur aux vacuoles retrouvées dans le cœur C57BL/6 (flèches roses et bleues). Les desmosomes ne semblent pas impactés (flèches blanches). La taille des sarcomères a été mesurée, et bien que les sarcomères soient moins réguliers (taille des sarcomères DeltaMex5 comprise entre 915 et 2661 nm versus taille des sarcomères C57BL/6 comprise entre 935 et 2457 nm) chez les souris DeltaMex5, la taille moyenne n'est pas significativement différente de celle des souris C57BL/6 (DeltaMex5 : 1957 ± 171 nm versus C57BL/6 : $2053 \pm 94,5$ nm, $P > 0,05$, $n = 4$ souris, 75 sarcomères et $n = 2$ souris, 38 sarcomères) (Figure 42C).

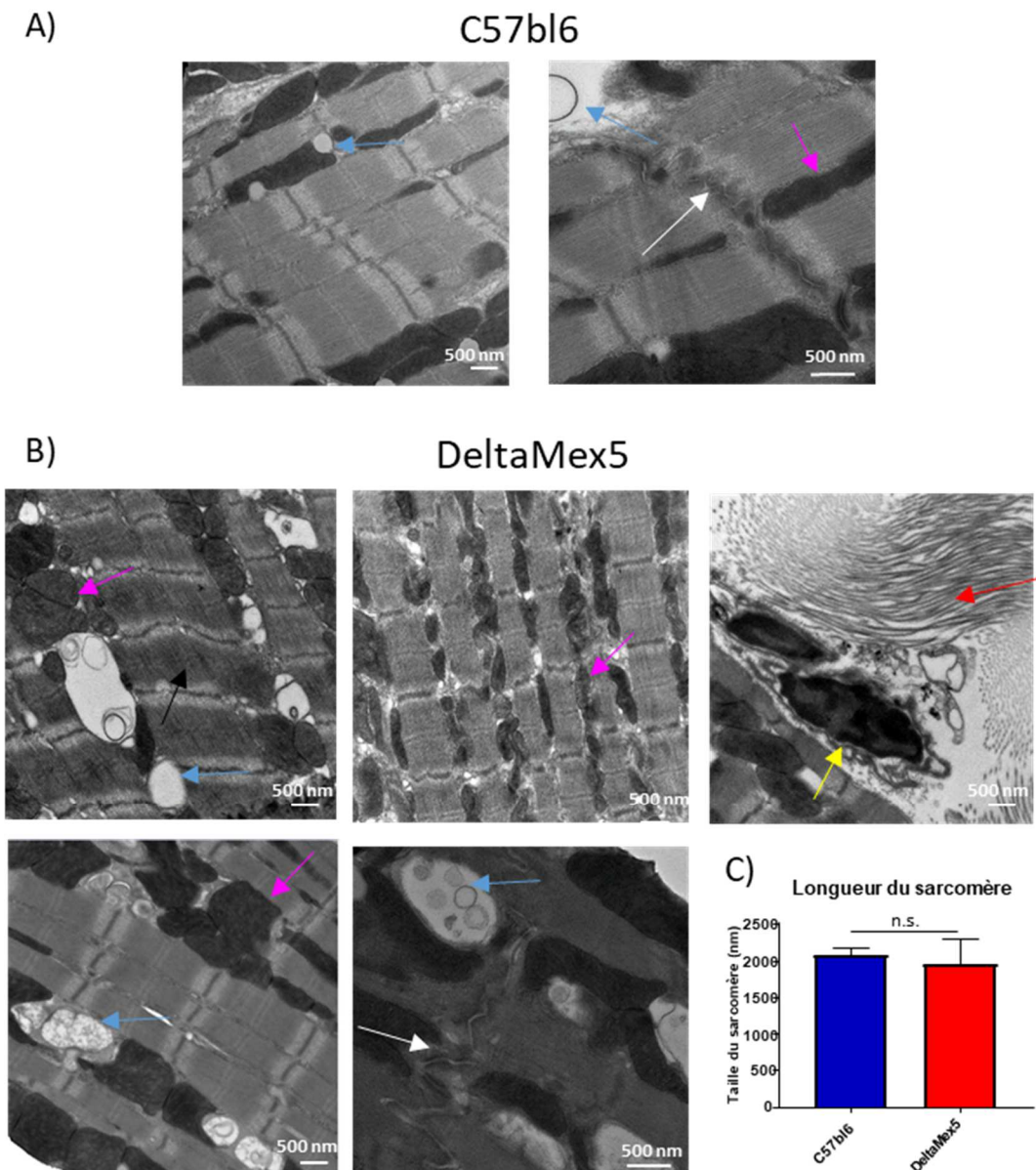


Figure 42 : Observation du muscle papillaire cardiaque en microscopie électronique.

A) Muscle papillaire d'une souris C57BL/6 de 4 mois. B) Muscle papillaire d'une souris DeltaMex5 de 4 mois. Flèches : noire = sarcomère irrégulier, blanc = desmosome, rouge = fibrose, rose = mitochondries, bleue = vacuoles, jaune = cellule inflammatoire. C) Mesure de la longueur moyenne des sarcomères. Test de Mann-Whitney.

I.B. Caractérisation fonctionnelle de la souris DeltaMex5

Une caractérisation fonctionnelle du muscle squelettique ainsi que du muscle cardiaque du modèle DeltaMex5 a été réalisée afin de compléter la caractérisation morphologique. Ainsi, les caractéristiques de force, d'élasticité et de fatigue ont été mesurées sur le muscle squelettique alors que le muscle cardiaque a été analysé par échographie et par une technique mesurant les relations entre la force et les volumes (boucle pression-volume). Pour rappel, le muscle cardiaque présente naturellement presque exclusivement des isoformes Mex5+ alors que les muscles squelettiques peuvent présenter un ratio d'isoformes Mex5+/Mex5- variable.

I.B.1. *Caractérisation fonctionnelle du muscle squelettique*

L'étude fonctionnelle du muscle squelettique a été effectuée sur le muscle soléaire (SOL) et sur le muscle long extenseur des orteils (EDL) prélevés sur des souris de 2 mois. Ces muscles ont été choisis car ils peuvent être prélevés intégralement, d'un tendon à l'autre sans être lésés, et sont donc habituellement utilisés pour les études fonctionnelles sur muscle isolé. Ils possèdent également des caractéristiques métaboliques différentes chez la souris. La titine étant une des protéines majeures du sarcomère, nous avons voulu évaluer s'il y avait un impact de la délétion de l'exon Mex5 sur les différentes propriétés du muscle. La force, l'élasticité et la fatigue ont notamment été étudiées.

I.B.1.a. Force musculaire

Après prélèvement du muscle entier, la force maximale déployée par le muscle est mesurée après stimulation du muscle, fixé entre ses deux tendons, à des fréquences croissantes de 0 jusqu'à 200 Hz à l'aide d'un appareil spécialisé. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les souris DeltaMex5 et les contrôles avec une force atteignant environ 175 N/cm² à une fréquence de 150 Hz pour le SOL ($P=0,489$, DeltaMex5 $n=7$ et C57BL/6 $n=8$), et pour l'EDL ($P=0,739$, DeltaMex5 $n=9$ et C57BL/6 $n=5$), bien qu'une tendance à une force supérieure semble être présente (Figure 43A). L'expression de la force à la fréquence de 150 Hz rapportée à la surface de section physiologique (PCSA), reflet du nombre de fibres musculaires, confirme la conservation de la force musculaire du SOL (Delta Mex5 : $195 \pm 5,2$ N/cm² versus C57BL/6 : $166,7 \pm 14,3$ N/cm², $P=0,059$) et de l'EDL (Delta Mex5 : $171,1 \pm 12,03$ N/cm² versus C57BL/6 : $146,5 \pm 12,58$ N/cm², $P=0,190$) (Figure 43B).

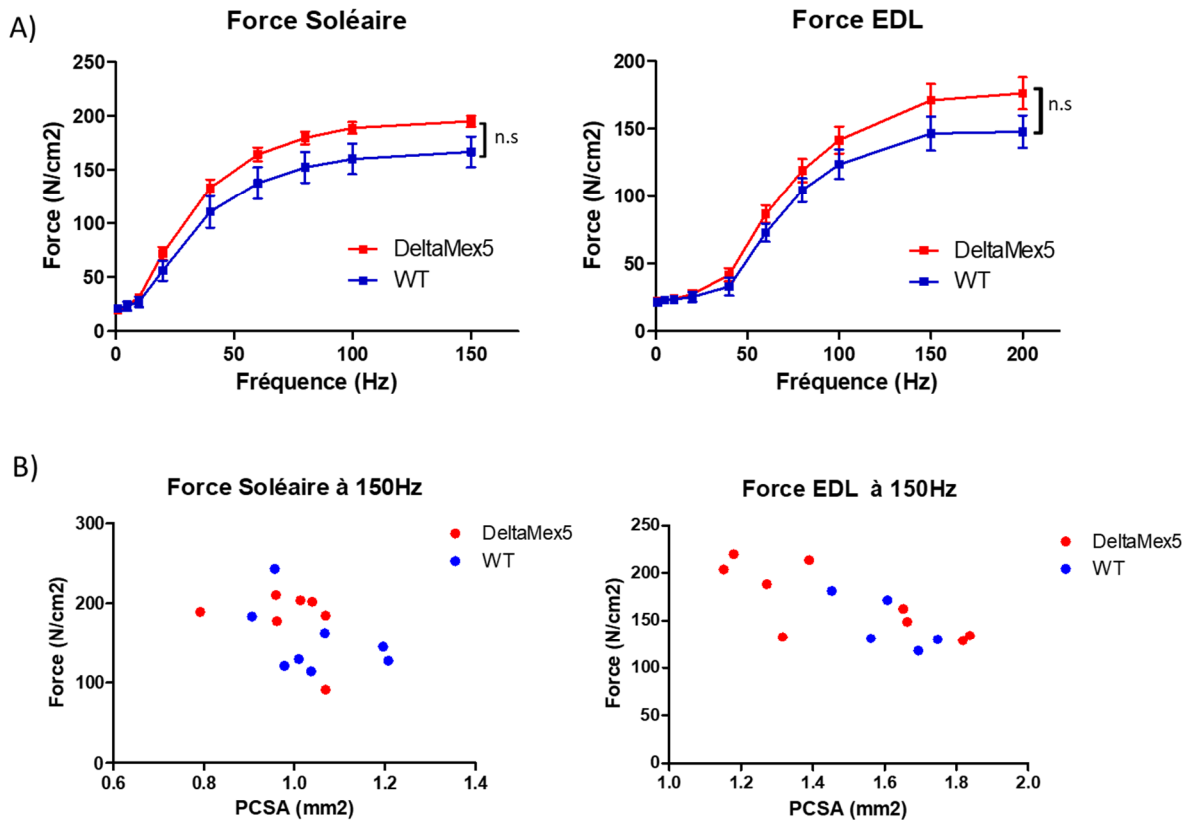


Figure 43 : Mesure de la force musculaire.

A) Force musculaire en N/cm² exercée par les muscles soléaires et EDL à une fréquence croissante. B) Force musculaire en fonction de la surface de section physiologique (PCSA) à une fréquence de 150 Hz. Test de Mann-Whitney.

I.B.1.b. Élasticité

La titine jouant un rôle important dans l'élasticité du sarcomère, nous avons donc voulu déterminer si cette dernière était impactée grâce à la mesure de l'étirement passif progressif des muscles. La force passive produite par le muscle est mesurée alors que le muscle est étiré progressivement à partir de sa longueur de détente, longueur en dessous de laquelle le muscle ne produit aucune force. La force passive subie par le muscle en fonction de l'étirement traduit l'élasticité du muscle. Elle reste équivalente dans le soléaire ($P=0,436$, DeltaMex5n =7 et C57BL/6n=13), ainsi que dans l'EDL ($P=0,739$, DeltaMex5n=11 et C57BL/6n=9) (Figure 44). L'élasticité du muscle n'est pas modifiée par la délétion de l'exon Mex5 à l'âge de 2 mois.

Résultats

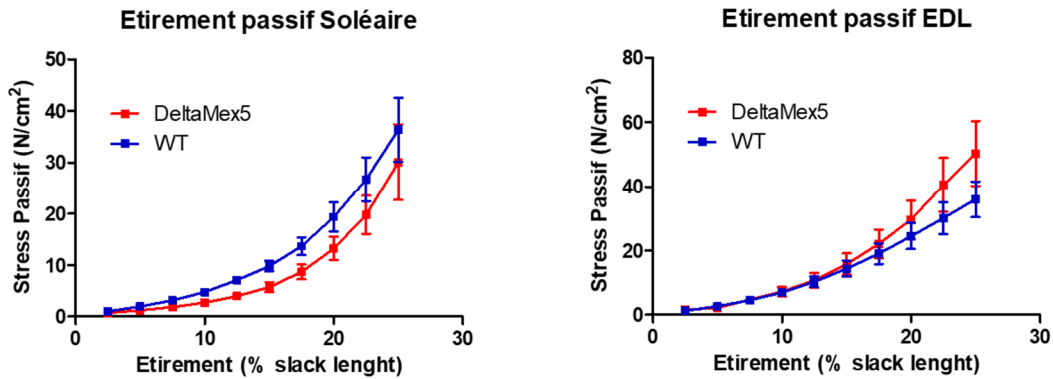
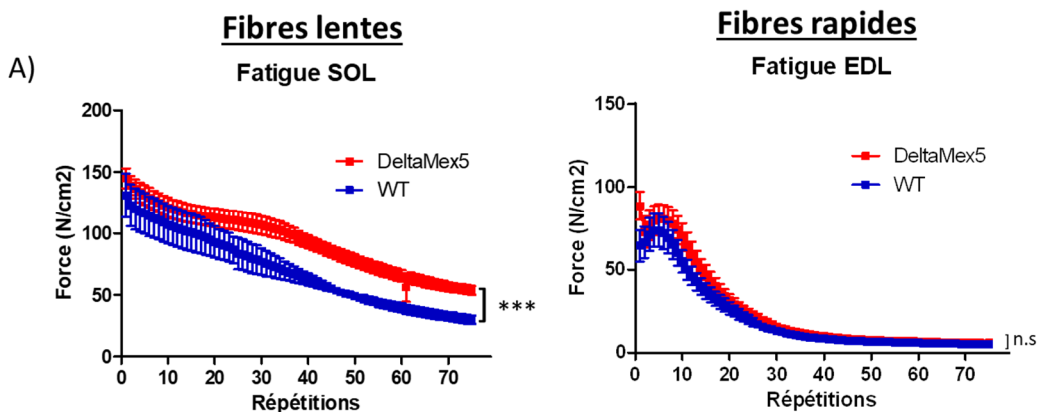


Figure 44 : Mesure de l'étirement passif des muscles soléaires et EDL.
Stress subi par le muscle en N/cm² en fonction de son étirement. Test de Mann-Whitney.

I.B.1.c. Fatigue musculaire

Pour terminer, nous avons voulu déterminer si les muscles du modèle présentaient une plus grande fatigabilité à l'effort. Dans ce test, la force produite par le muscle isolé est mesurée lors d'une succession de 75 contractions rapprochées. Le profil des deux types de muscles est différent : le muscle soléaire, constitué de fibres lentes, voit sa force diminuer progressivement au cours des répétitions des contractions, tandis que l'EDL, constitué de fibres rapides, ne génère de la force qu'au cours des premières répétitions, la force chutant ensuite (après 30 répétitions la force des muscles est presque nulle). La force générée par les soléaires des souris DeltaMex5 est significativement supérieure à celle générée par les soléaires WT sur les 75 contractions ($P < 0,0001$, DeltaMex5 $n = 6$ et nC57BL/6 $n = 4$), tandis qu'elle n'est pas différente pour les EDL ($P = 0,0872$, DeltaMex5 $n = 8$ et C57BL/6 $n = 4$) (Figure 45A). Cependant, si l'on ne considère que les 20 premières répétitions, la force générée par les EDL est également supérieure chez les souris DeltaMex5 ($P = 0,0491$) (Figure 45B). Les muscles des souris DeltaMex5 semblent avoir une meilleure résistance à la fatigue que ceux des souris C57BL/6 dans un temps initial pour l'EDL et sur la durée pour le soléaire.



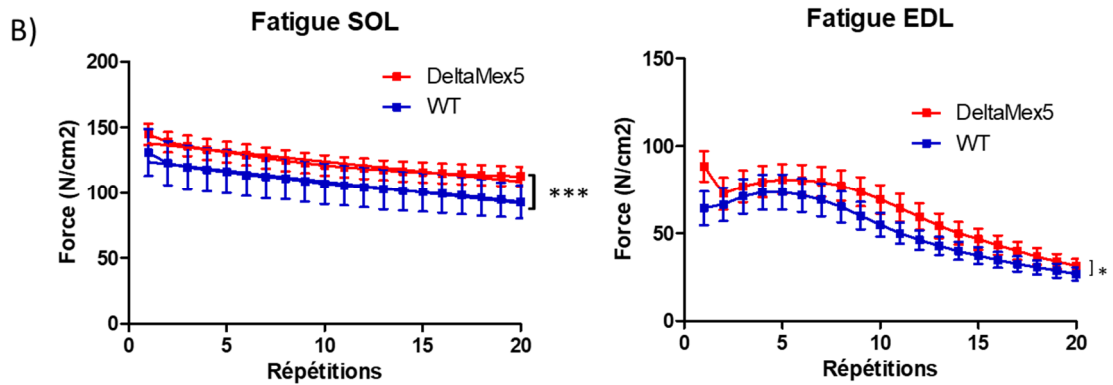


Figure 45 : Résistance à la fatigue musculaire après stimulation répétée des muscles SOL et EDL. Force musculaire en N/cm² en fonction du nombre de répétition des contractions. A) Après 75 répétitions. B) Après 20 répétitions. Test de Mann-Whitney.

I.B.2. Caractérisation fonctionnelle cardiaque

I.B.2.a. Echographie

Des mesures échographiques ont été faites chez les souris DeltaMex5 et leurs contrôles à différents âges pour caractériser la pathologie cardiaque et étudier son évolution au cours du temps. Les temps analysés sont 2, 3, 4, 9, 13 et 16 mois (Tableau 11).

Le rythme et le débit cardiaque sont préservés à tous les âges dans le cœur des souris DeltaMex5. Les premières différences significatives en se basant sur l'analyse échographique sont observées dès l'âge de 4 mois. La masse du ventricule gauche, qui est estimée à partir du diamètre du ventricule, de l'épaisseur du septum intraventriculaire et du mur postérieur en fin de diastole, est significativement supérieure chez les souris DeltaMex5 à 4 et 16 mois. La mesure du diamètre du ventricule gauche qui permet d'évaluer la présence d'une dilatation du ventricule gauche, est progressivement augmentée à partir de 3 mois. A 4 mois, le diamètre du ventricule gauche en fin de diastole augmente de 0,55 mm, soit plus de 12 % (DeltaMex5 : $4,83 \pm 0,22$ mm versus C57BL/6 : $4,28 \pm 0,09$ mm, $P = 0,015$, $n = 8$ et 11 , respectivement) (Figure 46). Une augmentation du volume du ventricule gauche ainsi que du diamètre du ventricule gauche en fin de systole est également observée à partir de 4 mois. La fonction du ventricule gauche, évaluée par la mesure de la fraction d'éjection ventriculaire en échographie est diminuée de façon progressive à partir de l'âge de 3 mois, bien que cela ne soit significatif qu'à 16 mois. A 4 mois, la fraction d'éjection est diminuée de 12 % (DeltaMex5 : 41 ± 5 % versus C57BL/6 : 53 ± 3 %, $P > 0,05$, $n = 8$ et 11) (Figure 46). La fraction de raccourcissement est diminuée chez les souris âgées à partir de 16 mois (Tableau 11, Figure 46). Ces données indiquent une altération de la fonction cardiaque dans le modèle Delta Mex5. Les deux principaux marqueurs de

Résultats

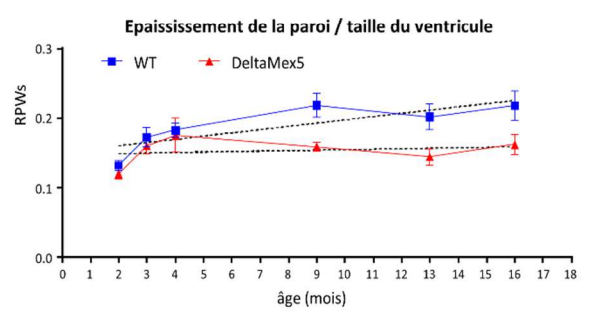
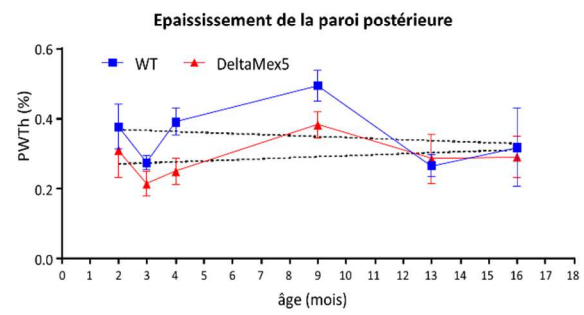
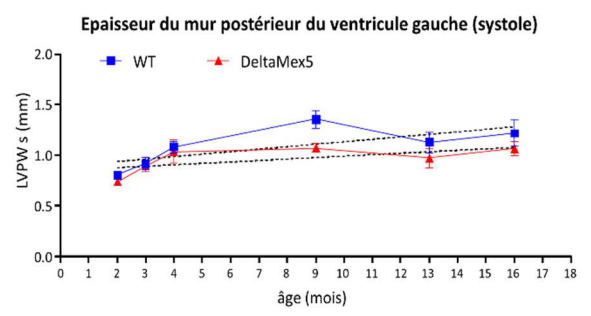
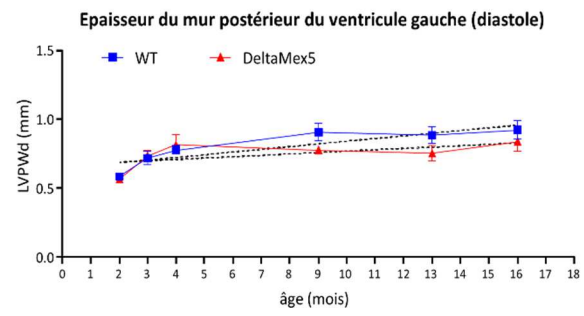
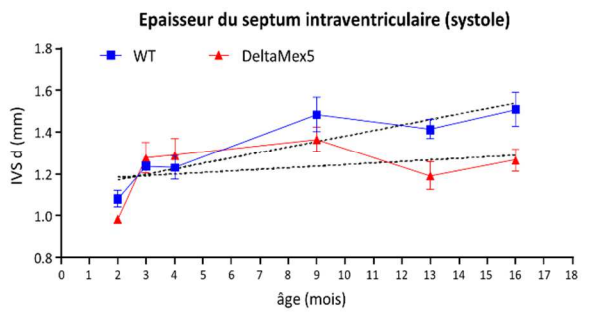
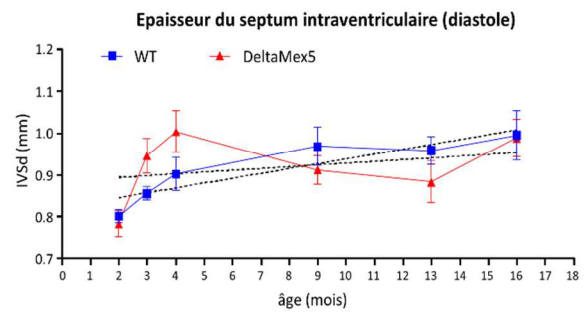
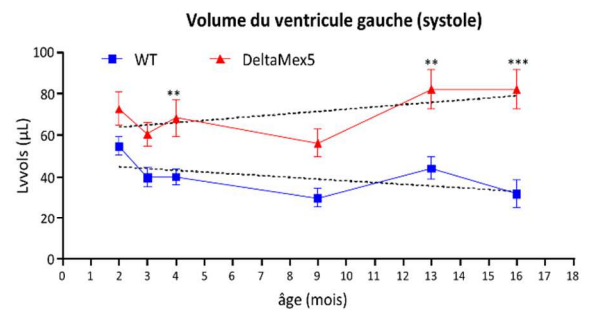
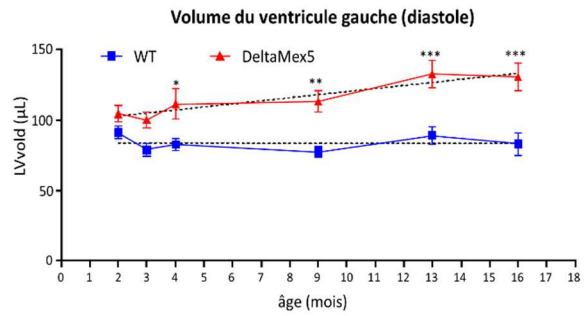
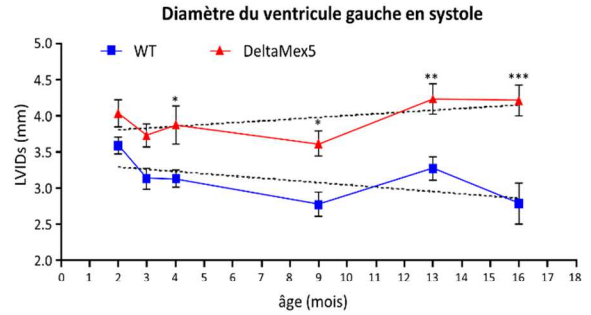
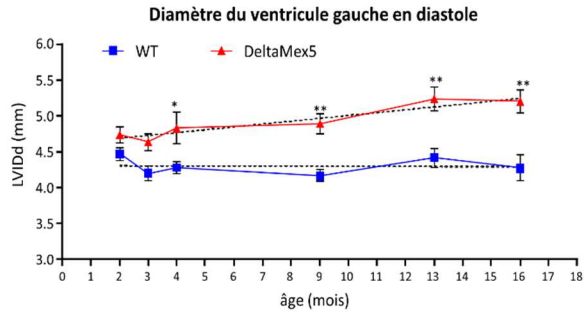
la DCM en échographie, la fonction systolique et la dilation du ventricule gauche sont modifiés. Au vu des mesures, l'âge de 4 mois a été sélectionné pour les analyses suivantes.

Tableau 11 : Evolution des principaux marqueurs mesurés en échographie au cours du temps.

Test ANOVA.

		2 mois	3 mois	4 mois	9 mois	13 mois	16 mois
Masse souris (g)	WT	24,4 ± 0,4 (n=7)	26,9 ± 0,9 (n=6)	28,8 ± 0,7 (n=11)	35,0 ± 1,2 (n=6)	38,9 ± 1,6 (n=6)	39,5 ± 2,1 (n=6)
	DeltaMex5	24,6 ± 1,1 (n=6)	28,5 ± 0,6 (n=8)	34,9 ± 1,3 ** (n=8)	36,6 ± 1,5 (n=7)	38,7 ± 1,7 (n=7)	38,9 ± 1,8 (n=7)
Masse ventricule gauche (mg)	WT	117,2 ± 3,8	123,9 ± 2,7	139,6 ± 6,2	155,6 ± 10,7	167,0 ± 8,4	168,0 ± 15,7
	DeltaMex5	125,3 ± 6,1	160,0 ± 7,8	190,0 ± 12,8 **	176,5 ± 9,6	191,3 ± 16,2	217,5 ± 19,2 *
Masse ventricule/masse totale	WT	4,8 ± 0,1	4,6 ± 0,1	4,9 ± 0,2	4,5 ± 0,4	4,3 ± 0,3	4,3 ± 0,4
	DeltaMex5	5,1 ± 0,2	5,6 ± 0,2	5,4 ± 0,3	4,9 ± 0,3	5,0 ± 0,4	5,6 ± 0,4 *
Rythme cardiaque (bpm)	WT	454 ± 19	493 ± 20	472 ± 24	437 ± 22	484 ± 23	490 ± 22
	DeltaMex5	469 ± 17	476 ± 17	466 ± 23	444 ± 27	462 ± 34	472 ± 23
Diastole							
Diamètre interne du ventricule gauche (mm)	WT	4,47 ± 0,09	4,20 ± 0,11	4,28 ± 0,09	4,17 ± 0,08	4,42 ± 0,13	4,28 ± 0,18
	DeltaMex5	4,74 ± 0,11	4,64 ± 0,12	4,83 ± 0,22 *	4,89 ± 0,14 **	5,23 ± 0,17 **	5,20 ± 0,16 **
Volume du ventricule gauche (µL)	WT	91,29 ± 4,52	79,03 ± 4,68	82,66 ± 3,92	77,27 ± 3,77	89,04 ± 6,23	83,02 ± 8,19
	DeltaMex5	104,64 ± 5,74	99,91 ± 5,70	111,37 ± 10,67 *	113,14 ± 7,86 **	132,61 ± 9,84 ***	130,56 ± 9,59 ***
Septum intraventriculaire (mm)	WT	0,80 ± 0,01	0,86 ± 0,02	0,90 ± 0,04	0,97 ± 0,05	0,96 ± 0,03	1,00 ± 0,06
	DeltaMex5	0,78 ± 0,03	0,95 ± 0,04	1,00 ± 0,05	0,91 ± 0,03	0,88 ± 0,05	0,99 ± 0,05
Epaisseur du mur postérieur (mm)	WT	0,59 ± 0,02	0,72 ± 0,05	0,77 ± 0,03	0,90 ± 0,06	0,88 ± 0,06	0,92 ± 0,06
	DeltaMex5	0,57 ± 0,03	0,73 ± 0,04	0,83 ± 0,07	0,77 ± 0,02	0,75 ± 0,06	0,84 ± 0,07
Systole							
Diamètre interne du ventricule gauche (mm)	WT	3,59 ± 0,12	3,14 ± 0,15	3,13 ± 0,12	2,78 ± 0,16	3,28 ± 0,16	2,79 ± 0,28
	DeltaMex5	4,04 ± 0,18	3,73 ± 0,16	3,88 ± 0,26 *	3,62 ± 0,17 *	4,24 ± 0,21 **	4,22 ± 0,22 ***
Volume du ventricule gauche (µL)	WT	54,69 ± 4,46	39,70 ± 4,70	39,90 ± 3,53	29,81 ± 4,44	44,15 ± 5,33	31,84 ± 6,73
	DeltaMex5	72,74 ± 8,08	60,43 ± 5,91	68,27 ± 9,11 **	56,19 ± 6,74	82,07 ± 9,47 **	81,20 ± 9,81 ***
Septum intraventriculaire (mm)	WT	1,08 ± 0,04	1,24 ± 0,01	1,23 ± 0,05	1,49 ± 0,08	1,42 ± 0,05	1,51 ± 0,08
	DeltaMex5	0,98 ± 0,02	1,28 ± 0,08	1,29 ± 0,08	1,37 ± 0,06	1,19 ± 0,07	1,27 ± 0,05
Epaisseur du mur postérieur (mm)	WT	0,80 ± 0,04	0,91 ± 0,06	1,08 ± 0,05	1,35 ± 0,09	1,12 ± 0,10	1,21 ± 0,13
	DeltaMex5	0,74 ± 0,04	0,89 ± 0,06	1,03 ± 0,12	1,07 ± 0,04	0,97 ± 0,09	1,06 ± 0,07
Fraction d'éjection (%)	WT	40 ± 3	50 ± 3	53 ± 3	62 ± 4	51 ± 3	64 ± 6
	DeltaMex5	31 ± 4	40 ± 3	41 ± 5	51 ± 3	39 ± 3	39 ± 4 ***
Fraction de raccourcissement (%)	WT	20 ± 1	26 ± 2	27 ± 2	34 ± 3	26 ± 1	35 ± 5
	DeltaMex5	15 ± 2	20 ± 2	20 ± 3	26 ± 2	19 ± 2	19 ± 2 ***
Débit cardiaque	WT	16,7 ± 1,4	19,3 ± 1,0	20,1 ± 1,1	20,7 ± 1,2	21,7 ± 1,0	25,2 ± 2,4
	DeltaMex5	14,8 ± 1,1	18,8 ± 1,4	19,9 ± 1,9	25,4 ± 2,0	23,1 ± 1,8	23,2 ± 1,6

Résultats



Résultats

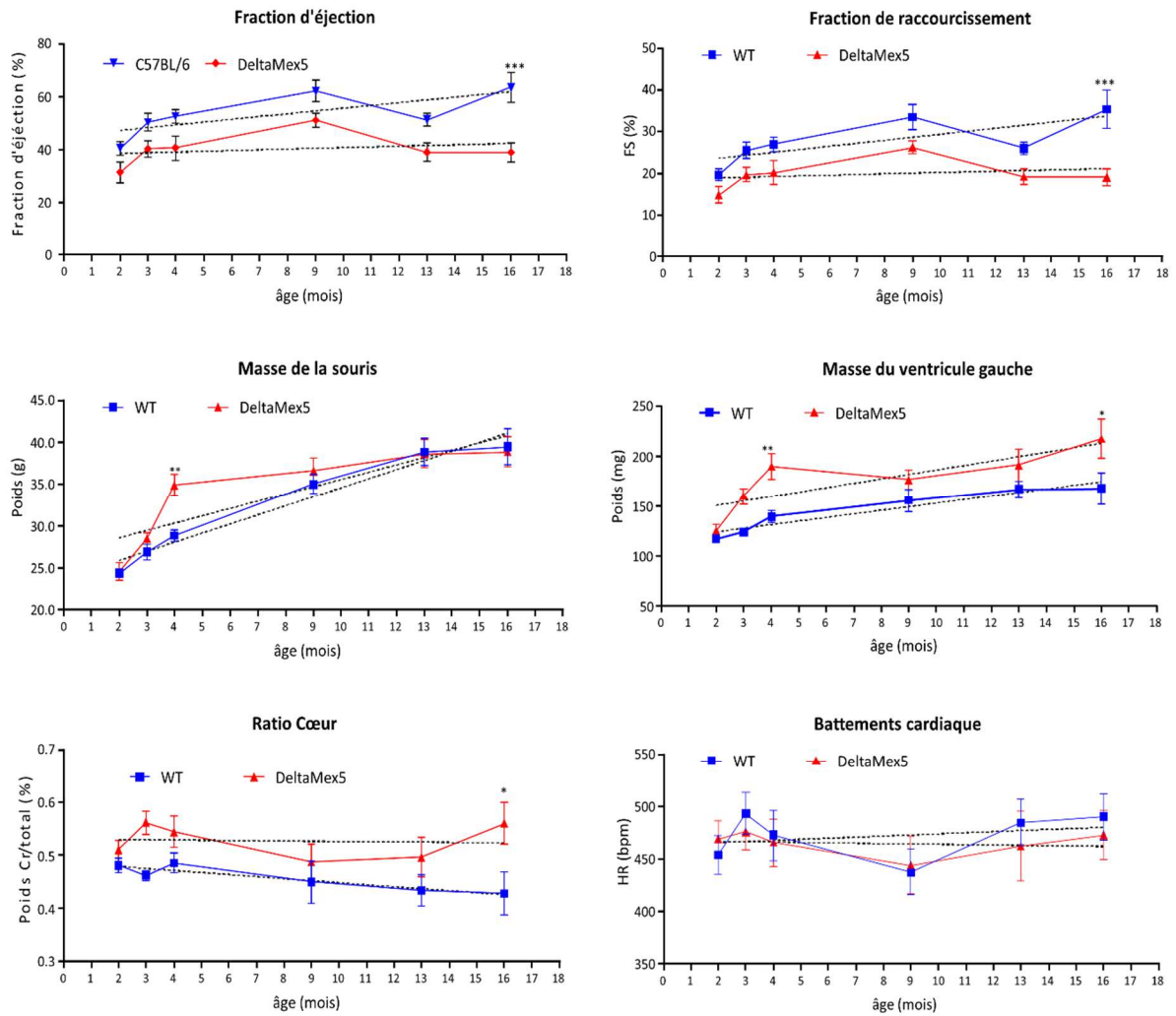


Figure 46 : Evolution des principaux marqueurs mesurés en échographie au cours du temps.
n=6-8. Test ANOVA.

Échographie de stress induit par la dobutamine

L'échographie de stress est couramment utilisée dans la clinique humaine. Celle-ci est utilisée pour étudier la contraction du ventricule gauche, sous l'effet d'un stimulant cardiaque visant à reproduire les conditions de l'effort. Un stress induit permet d'exacerber les troubles cardiaques sans soumettre les animaux à un effort physique qui leur est difficile d'accomplir en raison de l'atteinte musculaire. La dobutamine est un agent inotrope dont l'activité primaire résulte d'une stimulation des récepteurs adrénergiques cardiaques. Elle permet d'induire un stress cardiaque.

L'échographie de stress à la dobutamine a été testée sur le modèle DeltaMex5 à 3 et 4 mois, afin de voir si une défaillance cardiaque pouvait être mise en évidence plus précocement. Aux deux âges il n'y a pas de différence significative avant et après l'injection de dobutamine sur les paramètres de diamètre du ventricule gauche et de fraction d'éjection (Figure 47A), malgré une augmentation du rythme cardiaque attestant de l'efficacité de la dobutamine. A l'histologie, le cœur des souris prélevé

Résultats

après la seconde échographie de stress à l'âge de 4 mois ne révèle pas d'augmentation du tissu fibrotique (Figure 47B). L'échographie de stress à la dobutamine ne semble pas avoir d'effet amplificateur de l'atteinte cardiaque dans le modèle DeltaMex5 et ne sera donc pas utilisée par la suite.

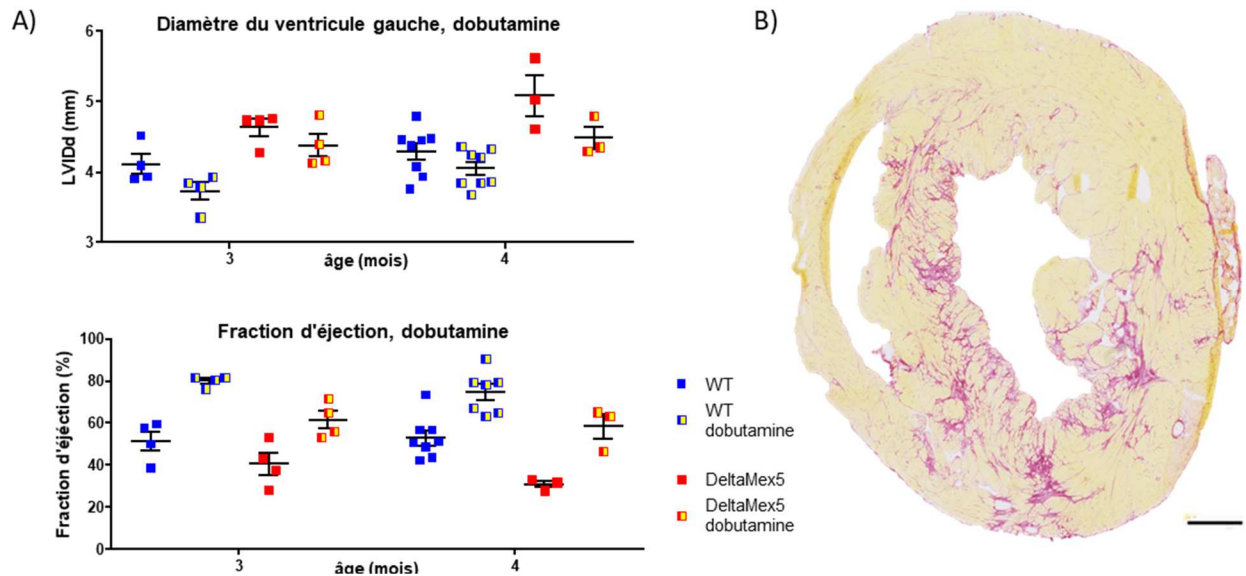


Figure 47 : Echographies de stress induit par la Dobutamine.

A) Mesure des principaux paramètres, le diamètre du ventricule gauche et la fraction d'éjection, n=4. Test ANOVA. B) Histologie d'un cœur de souris DeltaMex5 à 4 mois, après échographie de stress.

I.B.2.b. Mesure de la relation entre la pression intracardiaque et le volume du ventricule

L'analyse de la relation entre la pression intracardiaque et le volume du ventricule gauche permet la visualisation du cycle cardiaque (Figure 48). La boucle pression-volume est une représentation du travail ventriculaire au cours d'un cycle cardiaque.

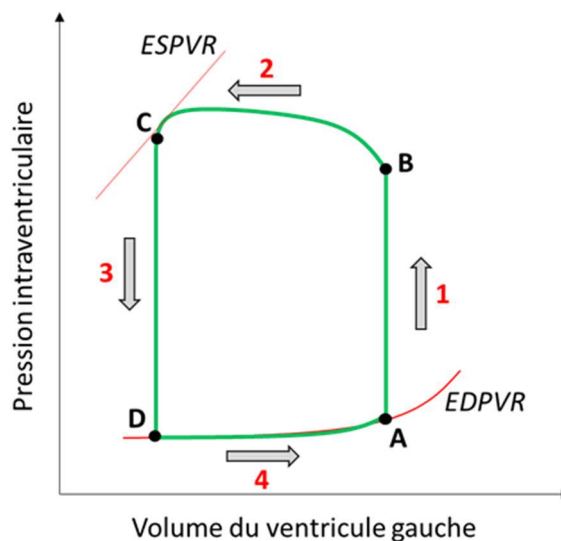


Figure 48 : La boucle de relation Pression / Volume.

A : fermeture des valves mitrales, début de la contraction. Phase 1 : phase iso volumétrique, remplissage ventriculaire. B : ouverture des valves aortiques. Phase 2 : éjection ventriculaire, la pression continue d'augmenter puis diminue avec l'arrêt de la contraction. C : fermeture des valves aortiques. Phase 3 : phase de relaxation, la pression chute rapidement. D : ouverture de la valve auriculo ventriculaire. Phase 4 : remplissage diastolique, la pente traduit la compliance générale. ESPVR : Relation Pression-Volume en fin de systole. EDPVR : Relation Pression-Volume en fin de systole.

Une analyse Pression-Volume a été réalisée chez des souris de 4 mois. Les boucles montrent qu'en comparaison des souris témoins, la relation entre la pression et le volume en fin de systole (ESPVR) est décalée vers la droite (Figure 49A). Les volumes en fin de systole et en fin de diastole sont augmentés (DeltaMex5 : $55,95 \pm 10,86 \mu\text{l}$ versus C57BL/6 : $26,18 \pm 4,12 \mu\text{l}$, $P = 0,03$, et $91,37 \pm 10,74 \mu\text{l}$ versus $66,59 \pm 5,42 \mu\text{l}$, $P > 0,05$, $n=5$) (Figure 49B). L'élastance à la fin de la systole, qui donne un indice de la contraction du myocarde, tend à être diminuée (DeltaMex5 : $2,51 \pm 0,67 \text{ mmHg}/\mu\text{l}$ versus C57BL/6 : $4,08 \pm 0,66 \text{ mmHg}/\mu\text{l}$, $P > 0,05$, $n=5$) (Figure 49C), comme dP/dt max (DeltaMex5 : $7903 \pm 582 \text{ mmHg}/\text{sec}$ versus C57BL/6 : $9155 \pm 984 \text{ mmHg}/\text{sec}$, $P > 0,05$, $n=5$) (Figure 49D). La relation entre la pression et le volume en fin de diastole (EDPV) et son coefficient β qui décrit les propriétés passives du myocarde restent inchangées (DeltaMex5 : $0,031 \pm 0,004 \text{ mmHg}/\mu\text{l}$ versus C57BL/6 : $0,029 \pm 0,009 \text{ mmHg}/\mu\text{l}$, $P > 0,05$, $n=5$) (Figure 49E). L'analyse révèle qu'il n'y a pas de changement dans la rigidité cardiaque, mais une forte tendance à la diminution de l'inotropie cardiaque. La relation entre la pression intracardiaque et le volume du ventricule gauche suit le même modèle que dans les cardiomyopathies dilatées chez l'Homme : le ventricule gauche n'est pas capable de pomper assez de sang, les volumes du cœur en début et en fin de diastole augmentent, mais la pression reste inchangée.

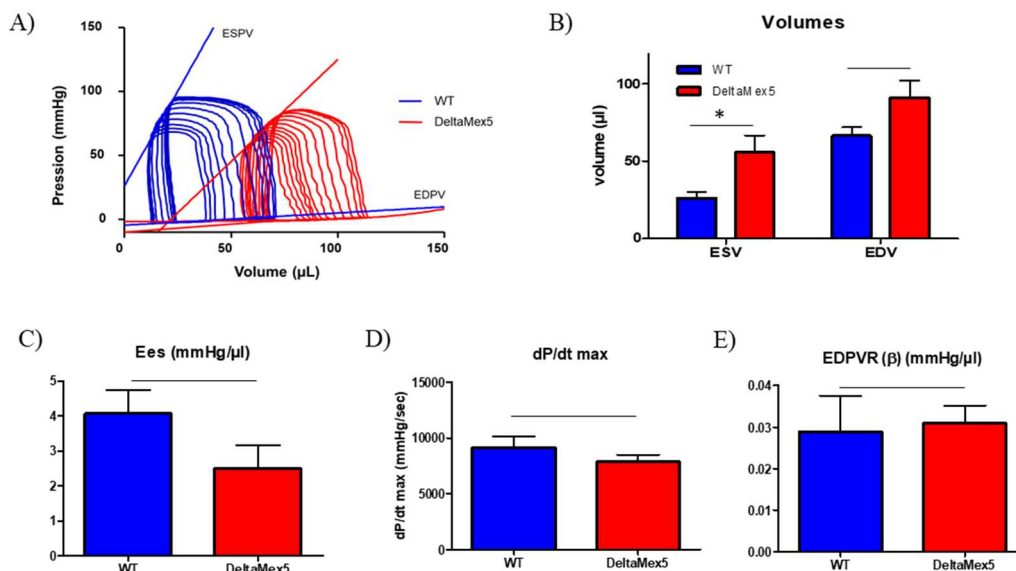


Figure 49 : Analyse de la boucle Pression/Volume.

A) Boucle pression/volume représentative des souris DeltaMex5 et C57BL/6 à 4 mois. ESPV : Relation Pression/Volume en fin de systole. EDPV : Relation Pression/Volume en fin de diastole. B) Volumes en fin de systole (ESV) et en fin de diastole (EDV). C) Ees : indice d'élastance en fin de systole. D) Relation dP/dt max. E) Coefficient β de la relation EDPV. Test de Mann-Whitney.

I.C. Caractérisation moléculaire

Nous avons enfin voulu définir dans quelle mesure la délétion de l'exon Mex5 avait un impact moléculaire dans les muscles et le cœur, en lien avec les atteintes histologiques et fonctionnelles observées, par une recherche des marqueurs transcriptionnels pathologiques et la caractérisation protéique de la titine et de ses partenaires.

I.C.1. Caractérisation moléculaire du muscle squelettique

I.C.1.a. Marqueurs transcriptionnels tissulaires du processus dystrophique

La présence de biomarqueurs tissulaires d'une atteinte musculaire a été recherchée par une RT-PCR quantitative sur de l'ARN extrait de soléaires de souris de 4 mois (Figure 50). Des gènes codants ainsi que des microARN, représentatifs de différents aspects du processus dystrophique (inflammation, fibrose, régénération) ont été sélectionnés. Le gène de l'acide ribophosphoprotéique *RPLPO* codant pour une protéine ribosomale, invariante dans les différentes conditions, a été choisi comme gène normalisateur pour les ARNm, et le miR-93 comme normalisateur pour les micro ARN. Le miR 142-3p, qui est un marqueur de l'inflammation, n'est pas augmenté dans le modèle (Ratio versus C57BL/6 = $2,44 \pm 0,96$, $P > 0,05$, $n=3$). Il en est de même pour les marqueurs de la fibrose : le miR 21 et le collagène 1A (Ratio versus C57BL/6 = $1,41 \pm 0,26$, $P > 0,05$ et Ratio versus C57BL/6 = $1,10 \pm 0,14$, $P > 0,05$, $n=3$). En revanche, les marqueurs de la régénération tissulaire, le miR 31, la myosine 8 (*Myh8*) et myomaker (*TMEM8C*) tendent à être augmentés (Ratio versus C57BL/6 = $11,89 \pm 3,68$, $P > 0,05$, Ratio versus C57BL/6 = $4,35 \pm 1,60$, $P > 0,05$ et Ratio versus C57BL/6 = $7,96 \pm 3,14$, $P > 0,05$, $n=3$).

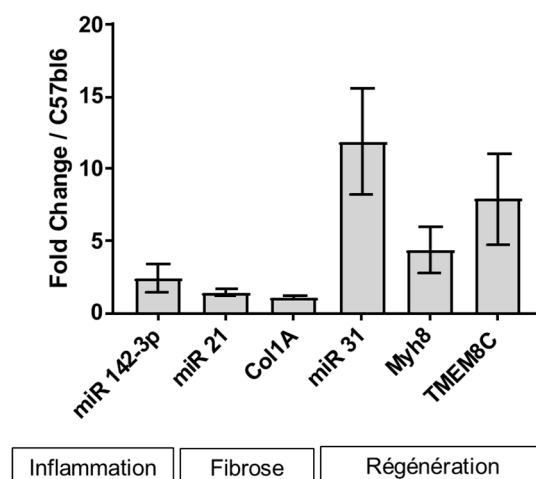


Figure 50 : Mesure RT-qPCR de différents marqueurs ARN de l'atteinte musculaire.

Analyse du muscle soléaire à 4 mois. Mesures exprimées en ratio (*fold change*) par rapport aux souris C57BL/6. Test de Mann-Whitney.

I.C.1.b. Analyse protéique de la titine dans le muscle

Nous avons ensuite voulu évaluer si la délétion de l'exon Mex5, et donc du domaine is7, dans le modèle aurait un impact sur la quantité de titine dans le muscle. Celle-ci a été quantifiée sur des soléaires de souris de 4 mois par migration d'extraits protéiques totaux sur gel d'agarose suivi d'un marquage par bleu de Coomassie (Figure 51A). Le soléaire a été sélectionné pour cette analyse pour la raison qu'il est normalement exclusivement is7+. Aucune différence n'est observée entre les ratios Nébuline/Myosine (MHC) des souris DeltaMex5 et C57BL/6 (DeltaMex5 : $0,094 \pm 0,017$ versus C57BL/6 : $0,068 \pm 0,014$, $P > 0,05$, $n=4/5$) ni entre les ratios de la Titine/Myosine (DeltaMex5 : $0,212 \pm 0,061$ versus C57BL/6 : $0,225 \pm 0,05$, $P > 0,05$, $n=4/5$). De plus, aucune isoforme de la titine supplémentaire n'est détectée (Figure 51B).

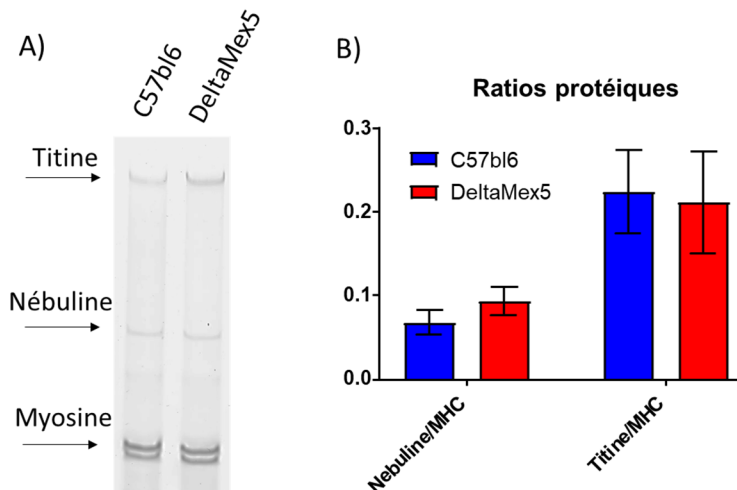


Figure 51 : Les ratios protéiques musculaire.

A) Gel d'agarose coloré en bleu de Coomassie d'extraits protéiques de soléaires de souris C57BL/6 et DeltaMex5 à 4 mois. La taille du domaine délété est trop petite pour qu'une différence de taille de la bande de la titine ne soit observée sur les gels. B) Quantification des ratios entre les différentes protéines. Test de Mann-Whitney.

Des analyses Western Blot ont été effectuées sur différents muscles à partir d'extraits protéiques totaux et ont permis de marquer spécifiquement les domaines carboxy terminaux de la titine et de déterminer si la délétion de l'exon Mex5 impactait également les domaines adjacents. Pour rappel, la ligne M de la titine est composé par une succession de domaines immunoglobuline (M1 à M10) intercalé par des séquences uniques d'insertion (is1 à is7) (Figure 52A). Les analyses ont été effectuées sur des souris C57BL/6, sur des souris DeltaMex5 homozygotes mais également sur des souris hétérozygotes pour la délétion. Les souris étaient âgées de 4 mois, et 3 muscles ont été analysés : le SOL, l'EDL et le TA. Différents domaines de la ligne M ont été analysés : M1, is5, is6, M8M9, is7 et M10, ainsi que Z1Z2 qui appartient au domaine amino-terminal de la Titine et qui permet de normaliser les résultats en se basant sur le fait qu'il n'y a pas de différence dans la quantité de titine totale chez les souris DeltaMex5 (Figure 52B).

Résultats

Aucune différence n'est observée entre les souris homozygotes et les souris C57BL/6 pour les marquages de M1, is5 et is6, quel que soit le muscle. Comme attendu, le marquage is7 est quasiment absent dans tous les muscles chez les souris homozygotes et dans le soléaire de souris hétérozygotes. Le niveau de marquage dans les deux autres muscles des souris hétérozygotes, l'EDL et le TA qui contiennent naturellement moins de titine Mex5 +, reste constant comparé aux souris C57BL/6. En revanche, de façon surprenante, les marquages de M8M9 et de M10, les domaines qui entourent is7, sont diminués de plus de 50 % chez les souris homozygotes. Chez les souris hétérozygote, le ratio de M8M9 reste stable, mais les ratios de M10 sont divisés par 1,5 dans les TA et EDL, et par 2 dans les SOL (Figure 52C).

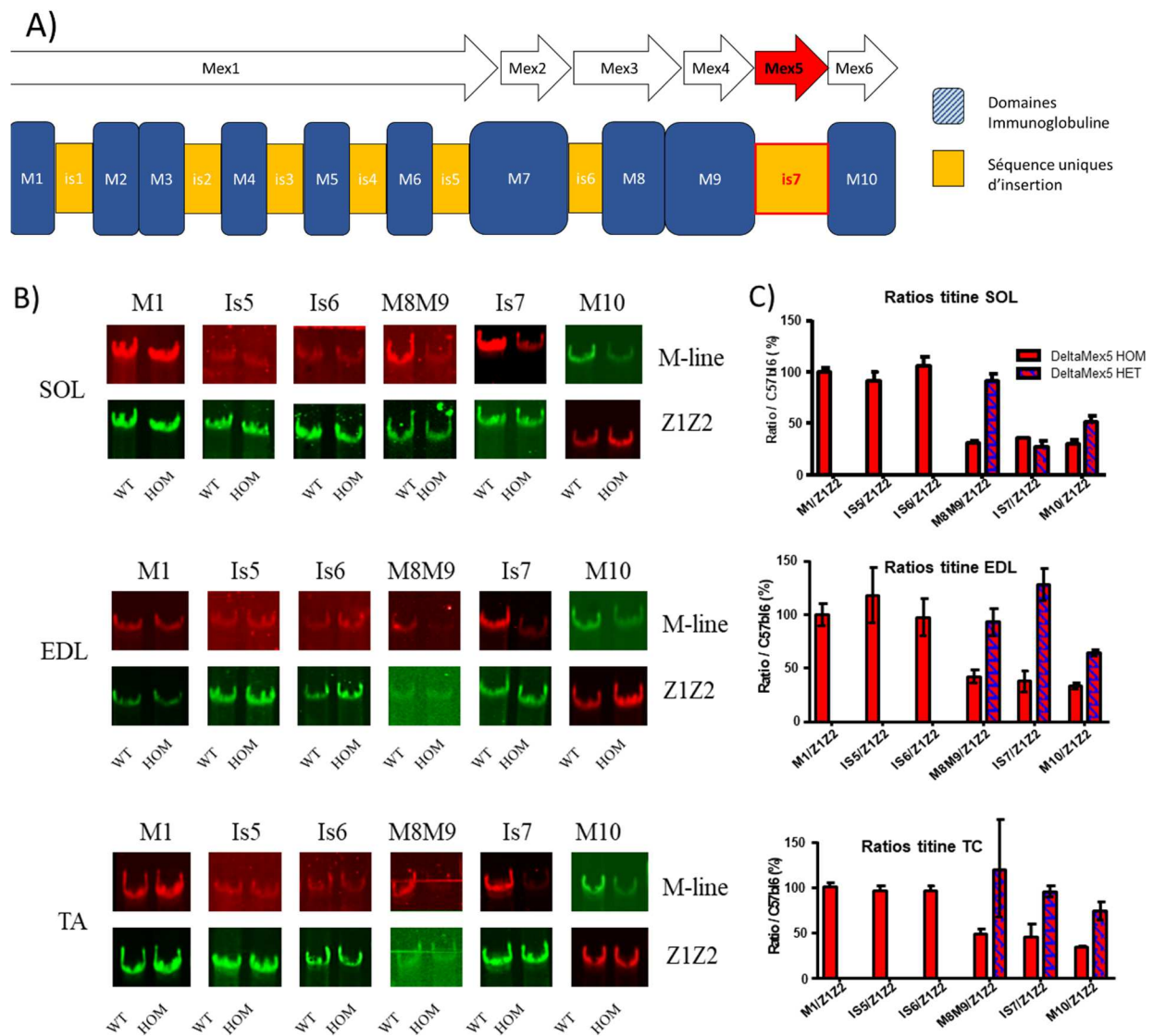


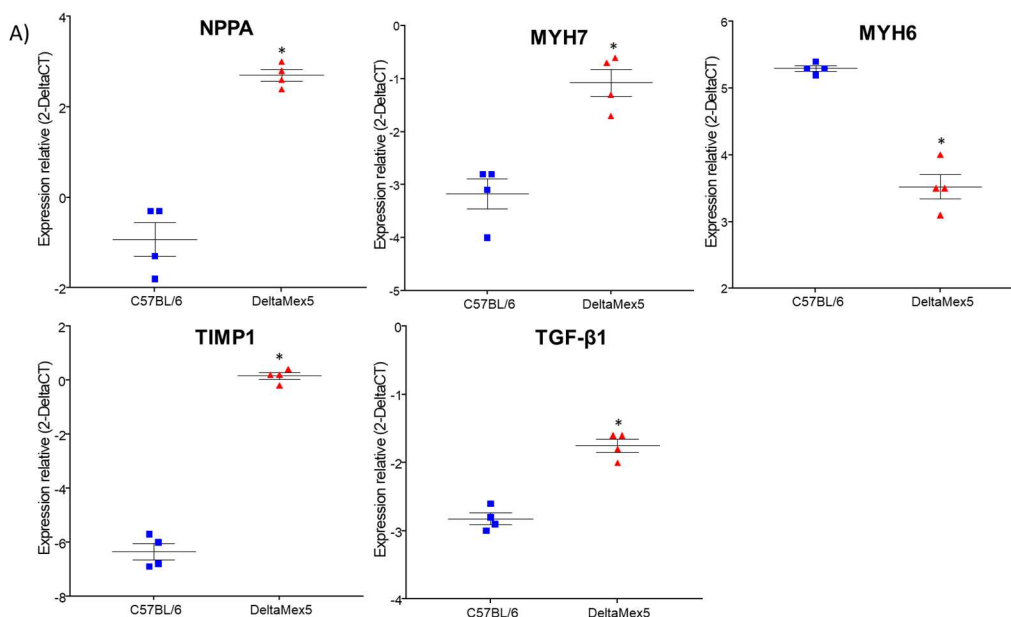
Figure 52 : Western Blot de la ligne M de la titine.

A) Organisation de la titine le long de la ligne M : exons Mex et domaines correspondants. B) Analyse Western Blot des muscles SOL, EDL et TC sur des souris âgées de 4 mois. Anticorps dirigés contre la région amino-terminale : Z1Z2 et la région carboxy-terminale : M1, is5, is7, M8M9, is7 et M10. C) Quantification des ratios de la titine pour les souris homozygotes ou hétérozygotes comparés aux souris C57BL/6. Chaque anticorps de la ligne M est normalisé par rapport à Z1Z2.

I.C.2. Caractérisation moléculaire du muscle cardiaque

I.C.2.a. Marqueurs transcriptionnels de la cardiomyopathie

La présence de biomarqueurs transcriptionnels tissulaires caractéristiques d'un remodelage cardiaque a été recherchée par une RT-PCR quantitative sur de l'ARN extrait de cœurs de souris de 4 mois (Figure 53). Le gène *Nppa* code pour le peptide natriurétique atrial qui participe à l'homéostasie cardiaque. Il est sécrété par les cardiomyocytes en réponse à une dysfonction du ventricule gauche et est utilisé comme marqueur sérique de l'insuffisance cardiaque chez l'Homme. Dans le cœur du modèle DeltaMex5 à 4 mois, son expression relative normalisée par *RPLPO* est significativement augmentée en comparaison du cœur des souris C57BL/6 ($P=0,02$). Les gènes *Myh7* et *Myh6* codant pour les chaînes lourdes des myosines cardiaques sont à l'équilibre en condition physiologiques, mais la balance est déséquilibrée en faveur de *Myh7* dans le cas des cardiomyopathies dilatées. C'est le cas dans notre modèle avec une augmentation significative de la forme *Myh7* ($P=0,02$) et une diminution de la forme *Myh6* ($P=0,02$). La présence de marqueurs d'une inflammation dans le cœur a également été recherchée. Le gène *Timp1* code pour l'inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase 1 est pro-fibrotique en inhibant la dégradation du collagène. Il est significativement augmenté dans le modèle ($P=0,02$), ainsi que *Tgf-β1* ($P=0,02$) qui est surexprimé dans les cardiomyopathies dilatées et un inducteur de la fibrose cardiaque. Enfin la présence des marqueurs de la fibrose a été recherchée sur les extraits de cœur de souris de 4 mois (Figure 53B). Les ARN codants pour les principales protéines composant la matrice extracellulaire ont été dosés : la fibronectine, la vimentine et les collagènes 1a1 et 3a1 sont tous significativement augmentés dans le cœur du modèle DeltaMex5 en comparaison des souris C57BL/6 ($P=0,02$) en accord avec les résultats obtenus à l'histologie.



Résultats

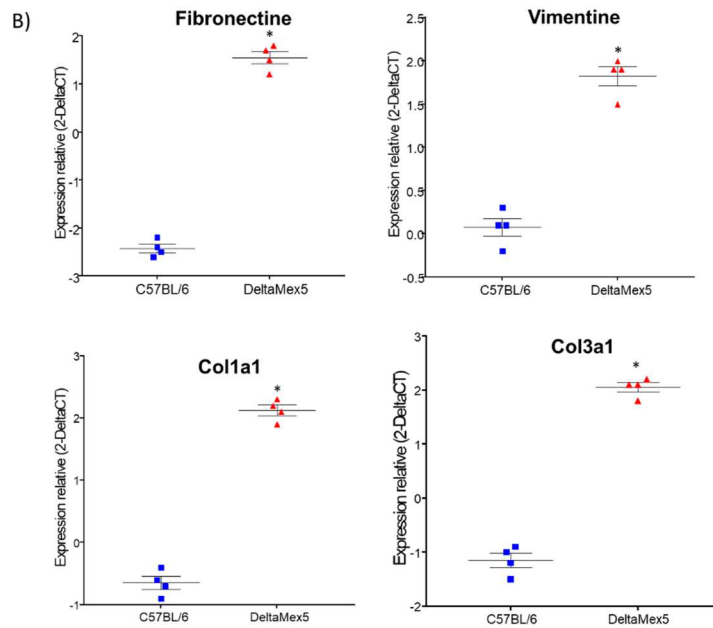


Figure 53 : Marqueurs transcriptionnels de la cardiomyopathie ;

A) Mesure RT-qPCR de différents marqueurs ARN de l'atteinte cardiaque à 4 mois. B) Mesure RT-qPCR de différents marqueurs ARN de la fibrose cardiaque à 4 mois. Mesures exprimées en expression relative des Ct par rapport au gène normalisateur *RPLPO*. Test de Mann-Whitney.

La microscopie électronique ayant révélé une atteinte des mitochondries dans le modèle, nous avons également voulu voir si cette atteinte était retrouvée au niveau des gènes impliqués dans le fonctionnement mitochondrial. Pour cela, nous avons utilisé un kit de PCR permettant le criblage de 84 gènes liés à la mitochondrie. Parmi les gènes inclus dans le test, 15 gènes sont surexprimés dans le modèle en comparaison des souris C57BL/6 au même âge (4 mois), confirmant la perturbation de la mitochondrie (Tableau 12). Ces gènes sont majoritairement des gènes impliqués dans l'induction de l'apoptose cellulaire et le transport mitochondrial.

Tableau 12 : RT2 profiler PCR array Mitochondrie.

Gene name	Description	Rôle	Fold Change	pValue
<i>Bak1</i>	BCL2-antagonist/killer 1	Apoptose	2,19	0,00156
<i>Bcl2l1</i>	Bcl2-like 1		1,808	0,00571
<i>Bid</i>	BH3 interacting domain death agonist		2,883	0,00622
<i>Bnip3</i>	BCL2/adonavirus E1B interacting protein 3		1,898	0,01637
<i>Cdkn2a</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A		2,216	0,04379
<i>Msto1</i>	Misato homolog 1 (Drosophila)		1,829	0,01262
<i>Pmaip1</i>	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1		4,3	0,00788
<i>Sfn</i>	Stratifin		2,917	0,00168
<i>Slc25a13</i>	Solute carrier family 25 , member 13		Transport mitochondrial	1,825
<i>Slc25a24</i>	Solute carrier family 25 , member 24	1,859		0,009
<i>Slc25a5</i>	Solute carrier family 25, member 5	1,838		0,02391
<i>Timm8a1</i>	Translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog a1	1,924		0,00413

Résultats

<i>Tomm20</i>	Translocase of outer mitochondrial membrane 20 homolog		1,85	0,00275
<i>Tomm70a</i>	Translocase of outer mitochondrial membrane 70 homolog A		1,85	0,01204
<i>Tspo</i>	Translocator protein		3,831	0,01966

I.C.2.b. Analyse protéique de la titine dans le cœur

L'impact du modèle sur la quantité des différents isoformes de la titine (N2B, N2BA, T2) et sur le ratio par rapport à la myosine a été quantifié sur des cœurs de souris de 4 mois par migration d'extraits protéiques totaux sur gel d'agarose suivi d'un marquage par bleu de Coomassie (Figure 54A). Aucune différence significative n'est observée entre les ratios de la Titine totale/Myosine (MHC) des souris DeltaMex5 et C57BL/6 ainsi qu'entre les différents isoformes de la titine. Une tendance à la diminution de l'isoforme N2BA est compensée par augmentation de N2B dans le modèle DeltaMex5 (Figure 54B).

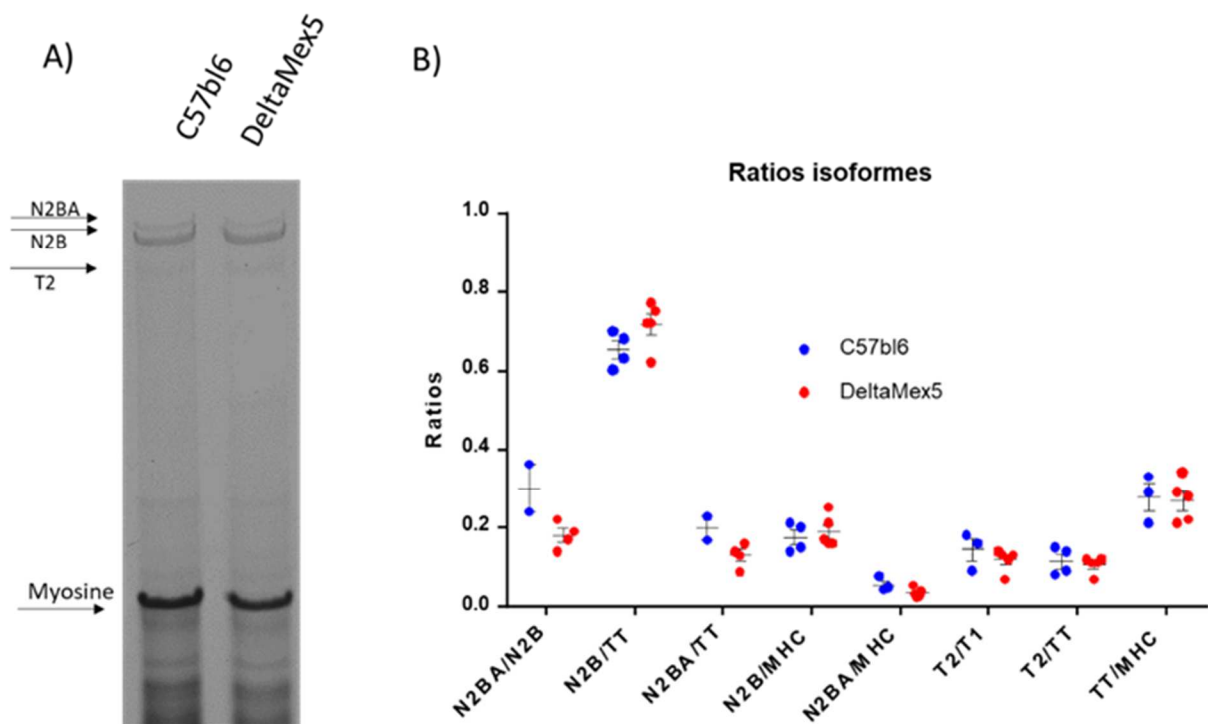


Figure 54 : Les ratios protéiques des différents isoformes de la titine.

A) Gel d'agarose coloré en bleu de Coomassie d'extraits protéiques de cœurs de souris C57BL/6 et DeltaMex5 à 4 mois. B) Quantification des ratios entre les différentes protéines et les isoformes de la titine. T1 = N2BA + N2B, T2 = produits de dégradation de la titine, TT = titine totale. Test de Mann-Whitney.

Les analyses Western Blot des domaines carboxy-terminaux de la titine effectuées sur les différents muscles ont également été effectuées sur le cœur (Figure 55A). Aucune différence n'est observée entre les souris homozygotes et les souris C57BL/6 pour les marquages de M1, is5 et is6. Comme attendu, le marquage is7 est quasiment absent chez les souris homozygotes et réduit de moitié

chez les souris hétérozygotes. Comme observé dans les muscles, les marquages de M8M9 et de M10, les domaines qui entourent is7, sont diminués de plus de 75 % chez les souris homozygotes. Chez les souris hétérozygotes, les ratios de M8M9 et de M10 sont diminués d'environ 50%. Ces données suggèrent une déstabilisation de la ligne M due à délétion de Mex5 qui n'impacte pas uniquement is7, mais également les domaines adjacents M8M9 et M10 (Figure 55B).

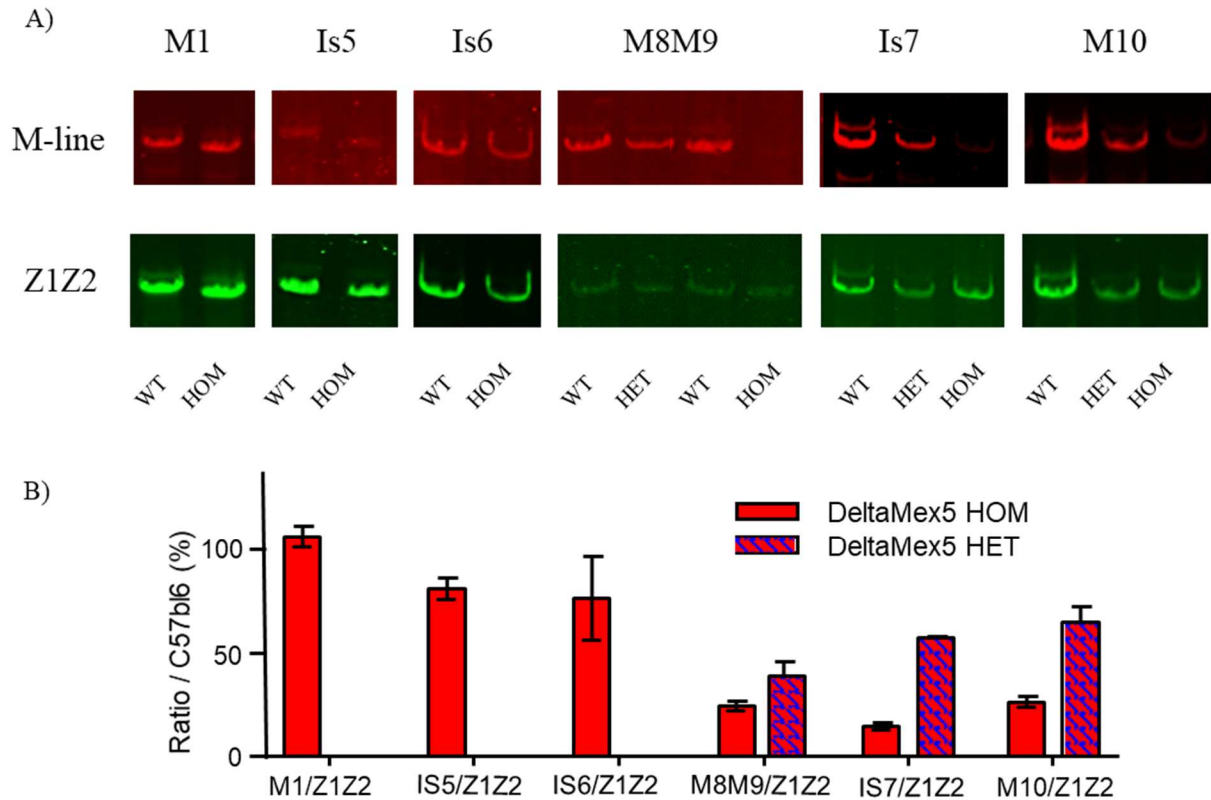


Figure 55 : Western Blot de la ligne M de la titine.

A) Analyse Western Blot du cœur sur des souris âgées de 4 mois. Anticorps dirigés contre la région amino-terminale : Z1Z2 et la région carboxy-terminale : M1, is5, is7, M8M9, is7 et M10. B) Quantification des ratios de la titine pour les souris homozygotes ou hétérozygotes comparés aux souris C57BL/6. Chaque anticorps de la ligne M est normalisé par rapport à Z1Z2.

Au vu des résultats de western blots et du marquage très faible des domaines adjacents à is7, nous avons voulu vérifier l'intégrité des exons finaux de la titine dans le génome de la souris DeltaMex5 (Figure 56). L'analyse confirme l'absence du domaine Mex5 chez la souris DeltaMex5 (Figure 56C) mais pas des domaines Mex4 et Mex6 l'entourant (Figure 56B et C).

Résultats

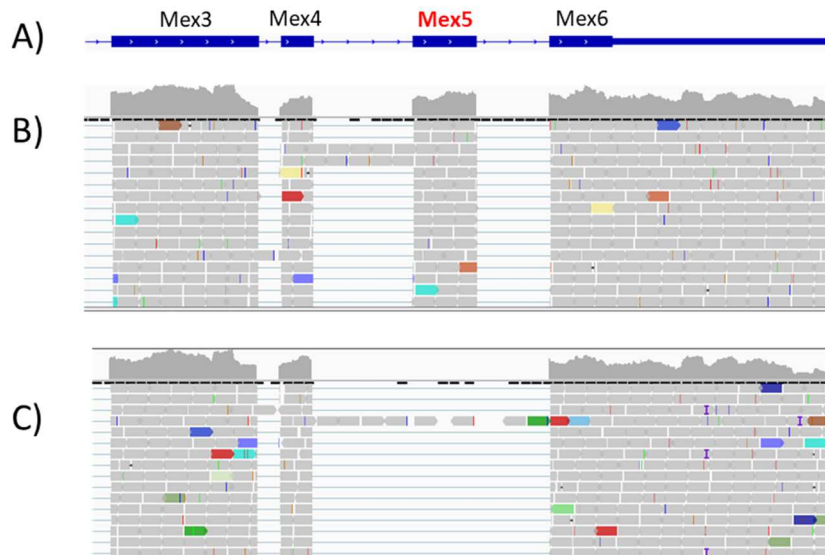


Figure 56 : Visualisation sur Integrative Genomic Viewer (IGV) des reads alignés sur le génome murin. Données de RNAseq sur des souris de 4 mois, fraction finale de la titine de Mex3 à Mex6. A) Schéma des exons finaux de la titine. B) C57BL/6. C) Delta Mex5.

I.C.2.c. Caractérisation de la ligne M

Nous venons de montrer que la délétion de Mex5 impacte les domaines adjacents à is7 que sont M8M9 et M10 selon l'analyse en western blot. Afin de déterminer la nature de cette modification et de savoir si les domaines de la ligne M restaient correctement organisés, un marquage immunohistologique a été effectué sur les domaines terminaux de la ligne M, ainsi que sur N2B situé dans la bande I de la titine.

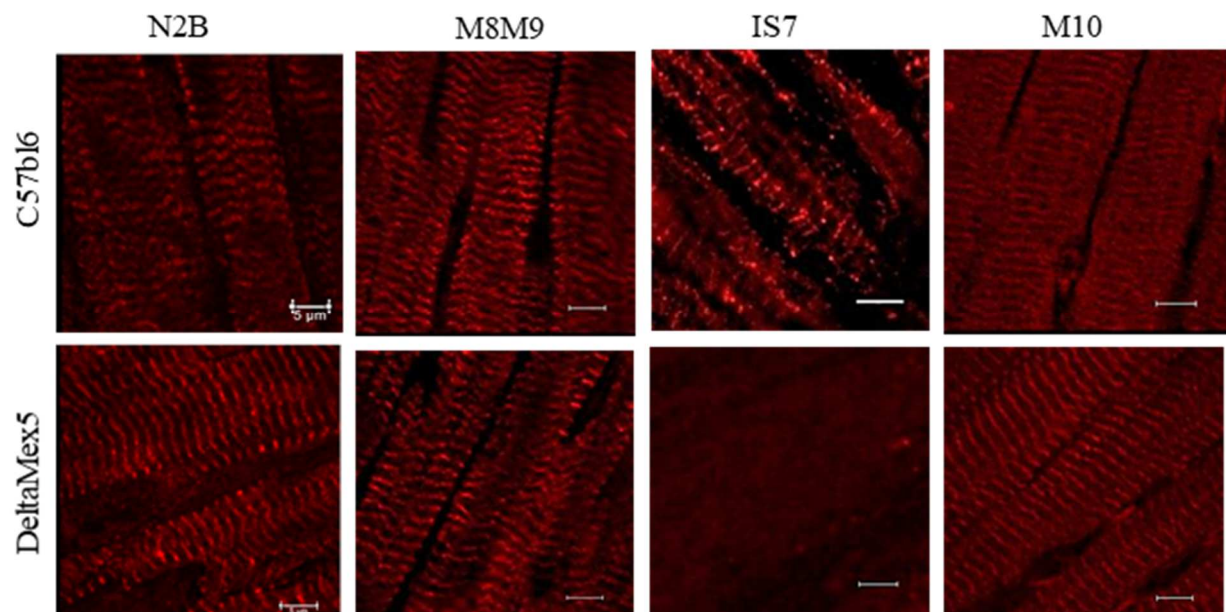


Figure 57 : Marquage immuno-histo fluorescent de N2B et des domaines terminaux de la titine M8M9, is7 et M10.

Souris DeltaMex5 et C57BL/6. Echelle, 5µm.

Résultats

Le marquage spécifique d'is7 montre une perte complète du domaine chez la souris DeltaMex5 comparée aux souris C57BL/6, tandis que les marquages de domaines M8M9 et M10 restent intacts, ainsi que la marquage de N2B (Figure 57). Ces données confirment la présence des domaines de chaque côté de la délétion de Mex5 et une intégration correcte de la titine entière dans le sarcomère.

Pour vérifier dans quelle mesure les domaines M8M9 et M10 sont affectés par la délétion de Mex5, une microscopie immuno-électronique a été réalisée avec des anticorps dirigés contre M8M9, is7 et M10 dans des échantillons de muscle papillaires (Figure 58A). Dans les sarcomères DeltaMex5, les épitopes des domaines M8M9 et M10 de titine sont marqués de manière irrégulière et certains sarcomères n'ont pas de marquage, tandis que la titine is7 est complètement absente. Le marquage M8M9 et is7 des sarcomères C57BL/6 sont quant à eux uniformes, cependant le marquage M10 n'est pas très prononcé bien que présent (Figure 58A). Ces résultats indiquent la présence des derniers domaines immunoglobuline de la titine de chaque côté de la suppression du domaine is7. La distance entre les épitopes à travers la ligne M augmente pour M8M9 (C57BL/6 : $87,79 \pm 1,43$ nm, DeltaMex5: $93,96 \pm 3,01$ nm, $P=0,049$, $n_{C57BL/6} = 25$, $n_{DeltaMex5} = 18$) et diminue pour M10 (C57BL/6 : $95,56 \pm 1,69$ nm, DeltaMex5: $89,81 \pm 1,90$ nm, $P=0,032$, $n_{C57BL/6} = 17$ et $n_{DeltaMex5} = 13$) (Figure 58B). Ces données suggèrent que l'extrémité de la Titine dans la ligne M n'est pas linéaire, bien que le marquage M10 ne soit pas suffisamment net pour tirer des conclusions définitives.

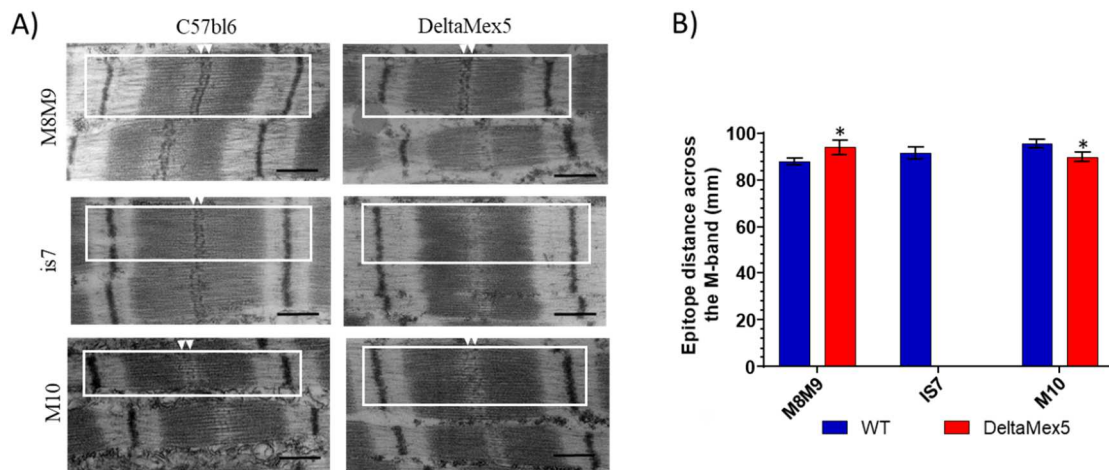


Figure 58 : Immuno-electro microscopie.

A) Marquage des domaines M8M9, is7 et M10. Echelle, 5 μ m. B) Quantification de la distance entre les épitopes de chaque côté de la ligne M en nm. Test de Student.

Au niveau de son domaine le plus terminal, M10, la titine se lie à plusieurs protéines : l' α -synémine, la myosprine et l'obscurine. Nous avons voulu étudier les conséquences du changement conformationnel de la fin de la ligne M sur ces protéines (Figure 59). Parmi les partenaires de la titine, seulement l' α -synémine présente un marquage homogène et intact entre les souris DeltaMex5 et les C57BL/6. Le marquage de l'obscurine est moins intense et est absent dans la plupart des sarcomères.

Le marquage de la myosprine est également plus faible, et présente une localisation différente, au niveau des jonctions entre les cardiomyocytes. La liaison entre le domaine M10 et ses partenaires semble donc impactée par la perte d'is7.

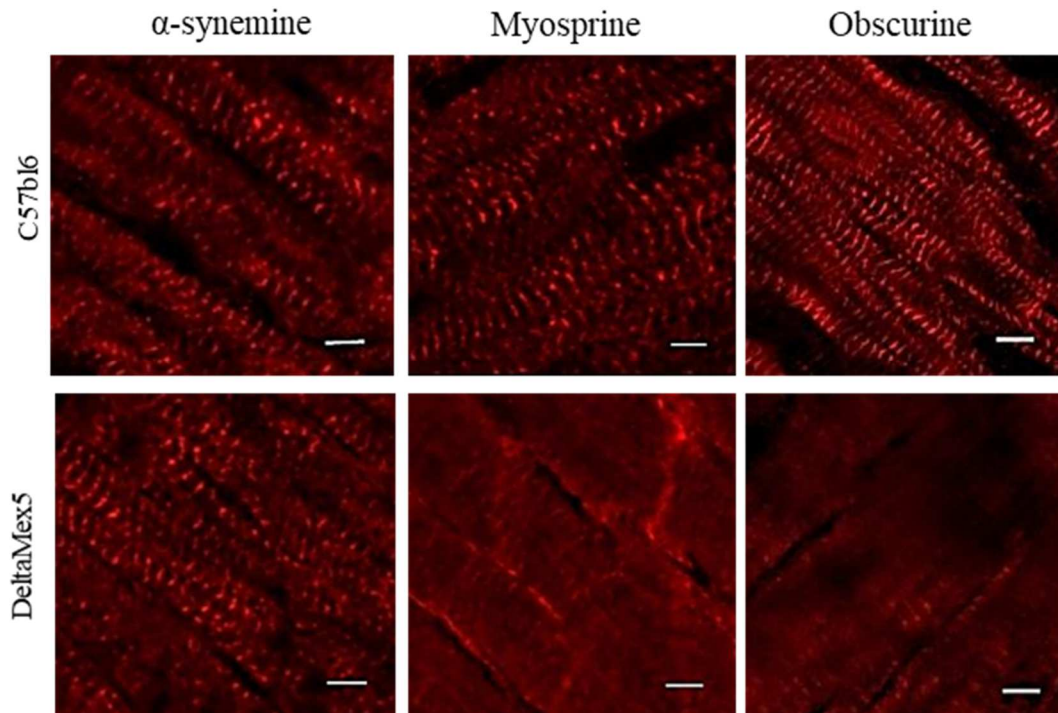


Figure 59 : Marquage immuno-histo fluorescent de partenaires du domaine M10, l'α-synémine, la myosprine et l'obscurine.
Souris DeltaMex5 et C57BL/6. Echelle, 5µm.

I.D. Conclusions de la caractérisation du modèle DeltaMex5

La délétion de l'exon Mex5 dans le modèle affecte principalement le cœur, tandis que les muscles sont relativement préservés. Le muscle soléaire, qui est le muscle le plus atteint du fait de sa composition en titine majoritairement Mex5+, présente une altération histologique avec la présence de fibrose et un processus de régénération musculaire, mais ne présente pas d'altération fonctionnelle. La caractérisation du phénotype cardiaque du modèle murin DeltaMex5 permet de le définir comme un modèle de cardiomyopathie dilatée. En effet, le cœur de souris DeltaMex5 présente des aspects caractéristiques de la cardiomyopathie dilatée : la présence importante de tissus fibrotique dans le cœur, une atteinte mitochondriale, une dilatation progressive du ventricule gauche et une dysfonction systolique dès l'âge de 3 mois, accompagnés de l'augmentation de nombreux marqueurs transcriptionnels propres à une atteinte cardiaque. Le phénotype du modèle pourrait être expliqué par une déstabilisation de la ligne M due à la délétion de l'exon Mex5 qui ne semble pas impacter uniquement le domaine is7, mais également les domaines adjacents M8M9 et M10 et la liaison à leurs partenaires.

II. Deuxième partie : Caractérisation du modèle DBA/2-mdx

La caractérisation du modèle DBA/2-mdx a déjà été publiée précédemment (Coley et al., 2016; van Putten et al., 2019; Vohra et al., 2017). Le modèle présente une cardiomyopathie hypertrophique, avec diminution de la fraction d'éjection et la présence de fibrose cardiaque. Nous avons cependant procédé à une caractérisation succincte du modèle dans notre laboratoire.

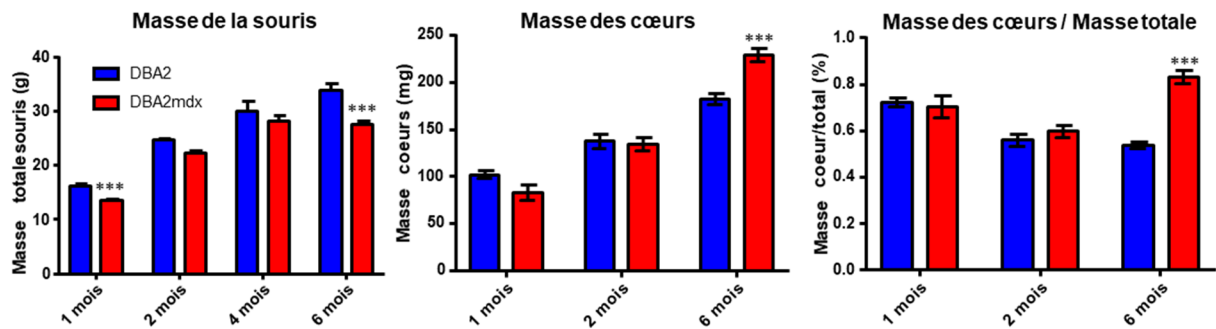


Figure 60 : Mesure de la masse des souris en fonction de l'âge.

Mesure de la masse du cœur en fonction de l'âge. Normalisation de la masse du cœur en fonction de la masse totale de la souris. Test ANOVA.

La masse des souris DBA/2-mdx est significativement inférieure à celle des souris DBA/2 à partir de 1 mois (DBA/2-mdx: $13,46 \pm 0,40$ g VS DBA/2: $16,19 \pm 0,49$ g, $P < 0,001$, nDBA/2-mdx = 34 et nDBA/2 = 35) et jusqu'à 6 mois (DBA/2-mdx: $27,65 \pm 0,52$ g VS DBA/2: $33,86 \pm 1,18$ g, $P < 0,001$, nDBA/2-mdx = 9 et nDBA/2 = 9). Le cœur est hypertrophié à l'âge de 6 mois (DBA/2-mdx: $229,24 \pm 7,17$ mg VS DBA/2: $181,85 \pm 5,78$ mg, $P < 0,001$) (Figure 60).

Des coupes de cœur de souris à différents âges (1 et 6 mois) ont été colorées par HPS et Rouge Sirius pour évaluer l'impact histologique. La coloration HPS révèle une pathologie cardiaque à 6 mois, visible par quelques aires de tissus abimés chez les souris DBA/2-mdx comparées aux tissus sains des souris contrôles, mais également par la présence de calcifications (Figure 61A). La coloration au Rouge Sirius démontre la présence de zones fibrotiques dans le cœur des souris DeltaMex5 à 6 mois qui sont principalement retrouvées en périphérie du myocarde (Figure 61B).

Résultats

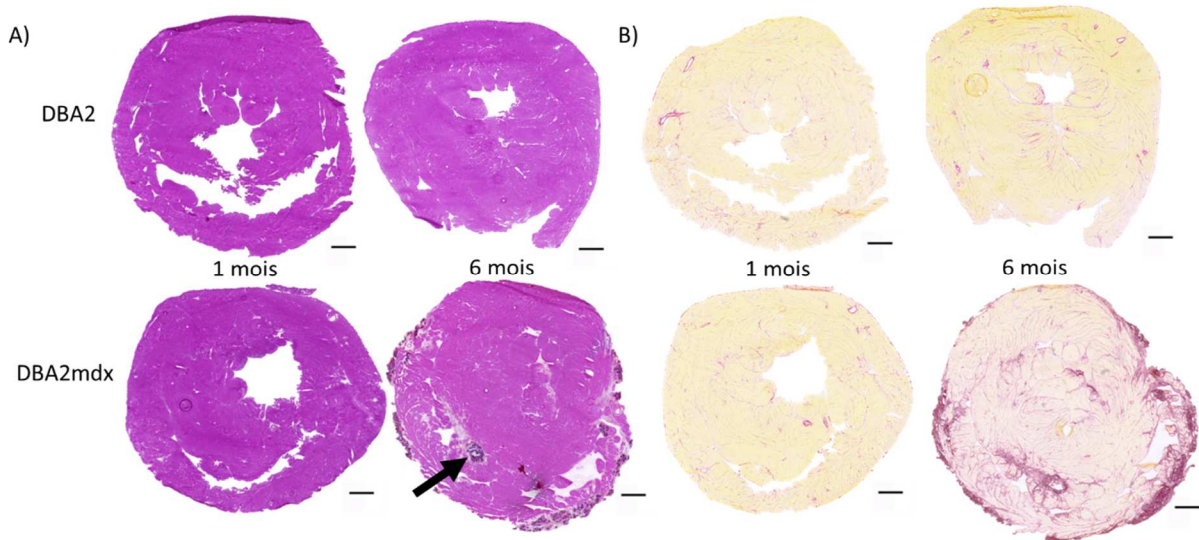


Figure 61 : Caractérisation histologique du cœur.

A) Coloration en HPS du cœur des souris DBA/2 et DBA/2-mdx à 1 et 6 mois. Flèche noire : calcifications. B) Coloration en Rouge Sirius du cœur des souris DBA/2 et DBA/2-mdx à 1 et 6 mois Echelle, 500 μ m.

L'échographie n'a pas permis de montrer d'augmentation des marqueurs de l'atteinte cardiaque à 4 et 6 mois (diamètre du ventricule gauche ou fraction d'éjection) (Figure 62). Cependant, le cœur des souris DBA/2-mdx a été très difficile à imager avec notre appareillage, ce qui a pu induire un biais dans les mesures.

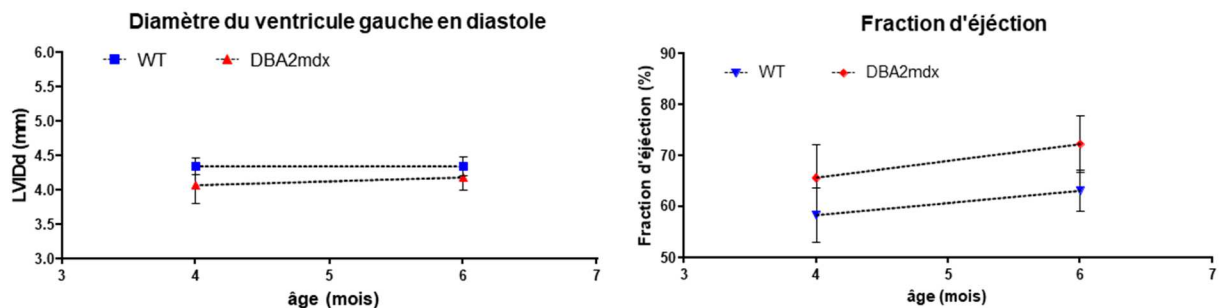


Figure 62 : Caractérisation échographique de la souris DBA/2-mdx.

Test de ANOVA.

En ce qui concerne les évaluations du muscle squelettique, une analyse d'échappement a été réalisée pour mesurer la force musculaire des souris à 6 mois, qui a révélé une diminution significative de la force des souris DBA/2-mdx comparée aux souris DBA/2 (Figure 63A). Une analyse pléthysmographique a également été effectuée chez les souris DBA/2-mdx à 2, 4 et 6 mois (Figure 63C), révélant une diminution des volumes d'inspiration et d'expiration, mais un temps de respiration égal à 2 et 4 mois bien qu'il tende vers une augmentation, selon le schéma proposé en Figure 63B. De façon intéressante, les paramètres sont normalisés à 6 mois. Un phénomène similaire avait déjà été décrit au niveau musculaire (van Putten et al., 2019).

Résultats

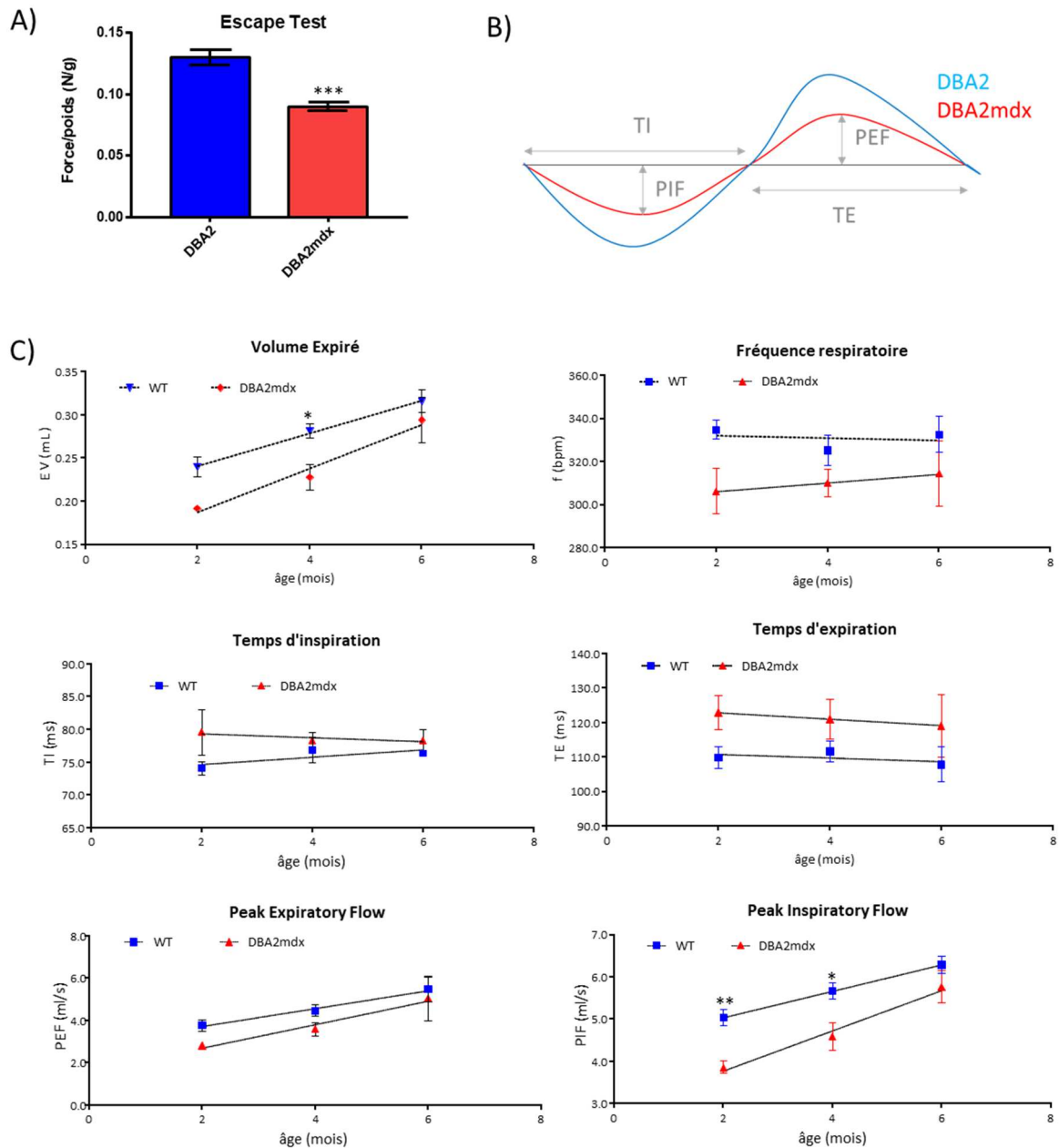


Figure 63 : Caractérisation de la souris DBA/2-mdx.

A) Analyses échographiques. A) Escape test. B) Courbes représentatives de la fonction respiratoire. C) Analyses pléthysmographiques. n = 5. Test ANOVA.

Le cœur DBA/2-mdx démontre une atteinte histologique spécifique, de par la présence de calcification et la répartition plus en périphérie de la fibrose, tandis que la répartition de la fibrose est plus homogène dans le cœur des souris DeltaMex5. Le phénotype cardiaque que nous observons sur la souris DBA/2-mdx et qui confirme ce qui a été rapporté dans la littérature, est une cardiomyopathie hypertrophique, tandis que le phénotype de la souris DeltaMex5 est une cardiomyopathie dilatée.

III. Troisième partie : Identification des voies de signalisation impliquées dans l'atteinte cardiaque

Cette troisième partie présente une étude de la perturbation de l'expression génique dans deux modèles de cardiomyopathie : le modèle DeltaMex5 et le modèle DBA/2-mdx. Tout d'abord nous avons voulu déterminer s'il existait des modifications communes entre ces deux modèles ainsi que l'âge auquel se mettent en place ces dérégulations et leur spécificité. Pour ce faire, nous avons réalisé une étude comparative de transcriptome à différents âges. Parmi l'ensemble des résultats, nous avons choisi ensuite de travailler sur 2 voies particulièrement dérégulées, les voies WNT et TGF- β .

III.A. Analyse RNAseq des deux modèles de cardiomyopathie

Une analyse de séquençage de l'ARN total (RNAseq) a été effectuée à partir d'échantillons de cœur de souris DeltaMex5 et DBA/2-mdx ainsi que leurs contrôles à un âge précoce et un âge avancé de l'atteinte cardiaque. Pour les souris DeltaMex5, les âges de 1 et 4 mois ont été choisis, et pour les souris DBA/2-mdx, les âges de 1 et 6 mois. Nous avons recherché ici principalement à identifier des gènes présents lorsque la pathologie est installée et qui seraient communs aux deux modèles de cardiomyopathie.

Le séquençage a été effectué selon le protocole Illumina. L'expression différentielle des gènes pour chaque échantillon est calculée par rapport à son contrôle à partir de leur nombre de *read* (>10). Les valeurs de différence d'expression (ou fold change) sont exprimées en logarithme binaire (\log_2 .FC) et sont associées à leur Pvalue ajustée *padj*. Les gènes exprimés significativement de façon différentielle entre les différentes conditions sont déterminés par un \log_2 .FC > |0,5| et une *padj* < 0,05.

Le volcano plot des données de RNAseq permet la visualisation pour chaque condition de la répartition des gènes et de l'importance de la dérégulation de ces gènes dans le cœur, ainsi que l'importance de la quantité d'expression des gènes. Les données obtenues sur le cœur du modèle DeltaMex5 à 1 et 4 mois sont présentées Figure 64 ainsi que la liste des 30 gènes les plus dérégulés à 4 mois dans le Tableau 13 (en Annexe 1 est présenté le tableau des gènes dérégulés à 1 mois).

Résultats

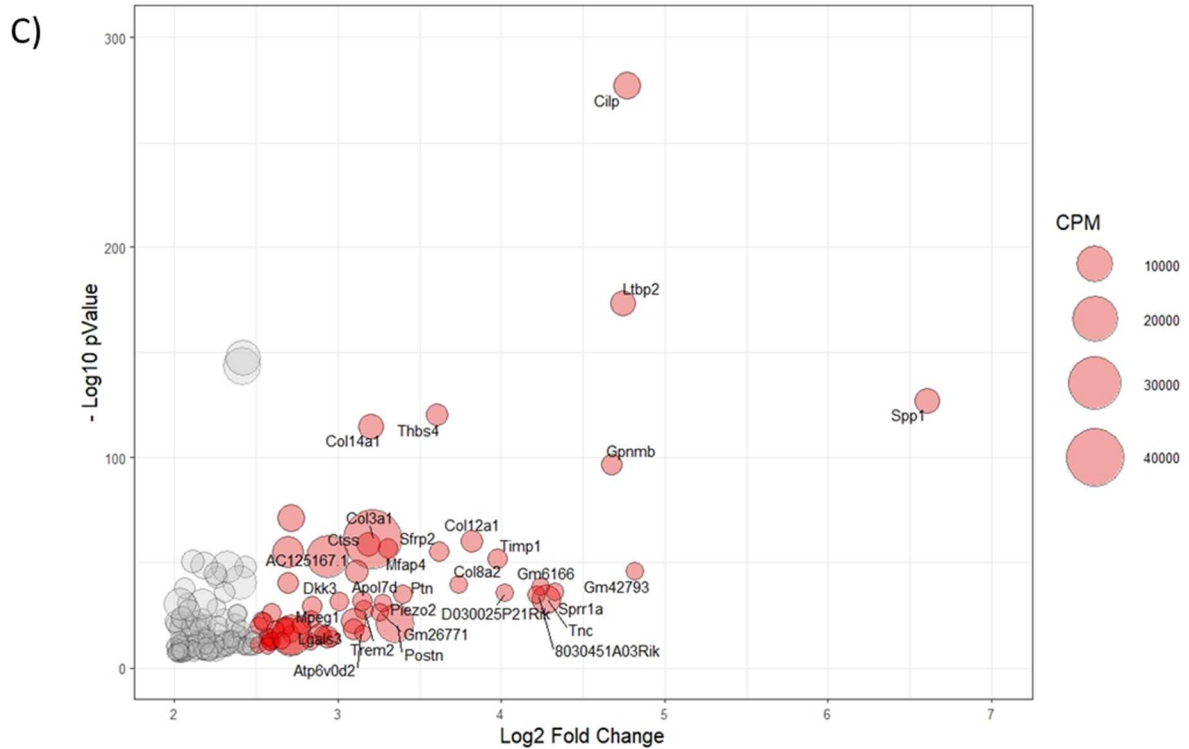


Figure 64 : Volcano plots DeltaMex5.

A) Volcano plot représentant les gènes dérégulés dans le cœur du modèle DeltaMex5 à 1 mois comparé aux souris contrôles. Log2 Fold Change en fonction de log10 pValue. B) Volcano plot représentant les gènes dérégulés dans le cœur du modèle DeltaMex5 à 4 mois comparé aux souris contrôles. Log2 Fold Change en fonction de log10 pValue. C) Focus du Volcano plot sur les gènes dont le FC est supérieur à 2. La taille de la représentation du gène est proportionnelle au nombre de read.

Le gène le plus augmenté dans le cœur du modèle DeltaMex5 à 4 mois est le gène de l'Ostéopontine (*Spp1*) ($\log_2FC = 6,6$, $P = 5,28E-128$). L'Ostéopontine est synthétisée par les macrophages après un infarctus, ainsi que par les fibroblastes cardiaques et les cellules endothéliales. Elle participe à la reconstruction du ventricule gauche en induisant la sécrétion de collagène et la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. C'est de plus une cible de la voie de signalisation WNT dans le cœur (Marchand et al., 2011; Zahradka, 2008). A noter que l'on retrouve également deux autres gènes dans cette liste qui appartiennent directement à la voie de signalisation WNT : *Sfrp2*, codant pour la *Secreted Frizzled-Related Protein-2* ($\log_2FC = 3,62$, $P = 2,08E-55$) et *Dkk3* codant pour la *Dickkopf related protein-3* ($\log_2FC = 3,01$, $P = 2,78E-32$). Le deuxième gène le plus augmenté est un gène prédit, *Gm42793*, dont la fonction n'est pas connue. Le troisième gène est le gène *Cilp*, codant pour la *Cartilage Intermediate Layer Protein* ($\log_2FC = 4,77$, $P = 4,70E-278$), un régulateur négatif de la voie TGF- β (Shindo et al., 2017). Le quatrième gène, *Ltbp2* ($\log_2FC = 4,74$, $P = 2,97E-174$), est un modulateur de la voie TGF- β et code pour la *Latent-Transforming growth factor Beta-binding Protein 2* (Sinha et al., 2002). A noter aussi que la Periostine encodée par *Postn* ($\log_2FC = 3,351948$, $P = 1,7E-21$) et le *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1* encodé par *Timp1* ($\log_2FC = 3,981384$, $P = 5,7E-52$)

Résultats

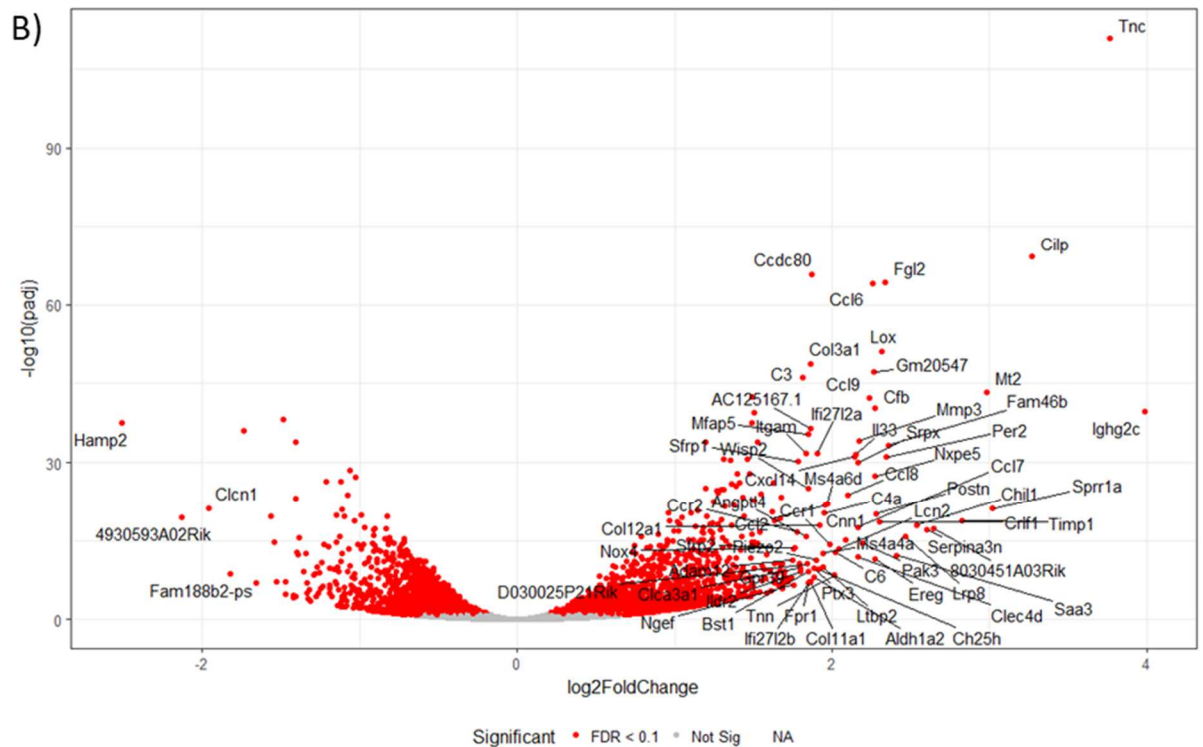
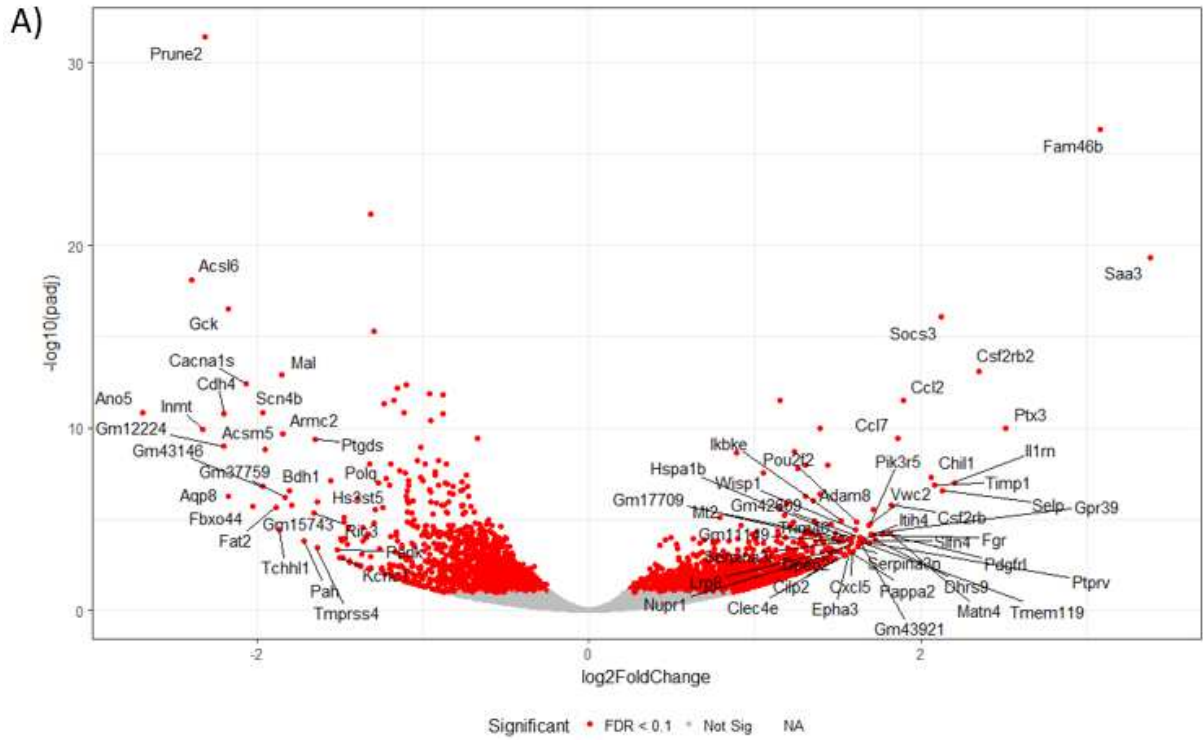
retrouvés dans les premiers gènes de liste sont des cibles de la voie TGF- β (Li et al., 2000; Snider et al., 2009). Le cinquième gène, *Gpnmb*, code pour la *GlycoProtein Nonmetastatic Melanoma protein B* qui est impliquée dans l'inflammation, la fibrose et la diminution de la fonction cardiaque après un infarctus (Jarve et al., 2017). A 1 mois, le nombre de gènes dérégulés est bien moins important et les gènes dérégulés le sont dans une moindre mesure avec un log2FC maximum de 1.

Tableau 13 : Top 30 des gènes les plus dérégulés dans le cœur du modèle DeltaMex5 à 4 mois.
Souligné = spécifique du modèle.

<i>Gene</i>	log2FC	padj	Moyenne DeltaMex5	Moyenne C57BL/6
<i>Spp1</i>	6,60	5,28E-128	2162,74	6,65
<i>Gm42793</i>	4,82	3,66E-46	212,55	0,00
<i>Cilp</i>	4,77	4,70E-278	3357,31	109,77
<i>Ltbp2</i>	4,74	2,97E-174	2206,18	68,03
<i>Gpnmb</i>	4,68	1,57E-97	764,57	19,98
<i>Sprr1a</i>	4,33	1,41E-36	222,75	1,39
<i>Tnc</i>	4,28	2,99E-33	4363,96	38,66
<i>Gm6166</i>	4,24	5,99E-39	171,45	2,01
<i>8030451A03Rik</i>	4,22	4,64E-35	206,04	1,72
<i>D030025P21Rik</i>	4,02	5,44E-36	153,86	2,87
<i>Timp1</i>	3,98	5,70E-52	625,54	24,25
<i>Col12a1</i>	3,82	2,14E-60	989,43	50,08
<i>Col8a2</i>	3,74	3,28E-40	247,08	10,59
<i>Sfrp2</i>	3,62	2,08E-55	501,17	30,20
<i>Thbs4</i>	3,61	3,79E-121	919,77	66,85
<i>Ptn</i>	3,40	1,25E-35	290,91	17,60
<i>Postn</i>	3,35	1,65E-21	12040,11	414,51
<i>Mfap4</i>	3,31	3,99E-57	428,05	35,05
<i>Piezo2</i>	3,27	2,87E-31	209,01	13,45
<i>Gm26771</i>	3,26	9,27E-27	132,29	7,36
<i>Col3a1</i>	3,22	1,72E-61	40685,43	3682,59
<i>Col14a1</i>	3,20	9,47E-116	2081,22	207,54
<i>Ctss</i>	3,19	3,04E-59	1773,00	162,81
<i>Trem2</i>	3,16	2,89E-28	259,21	17,93
<i>Atp6v0d2</i>	3,15	2,67E-17	58,07	0,67
<i>Apol7d</i>	3,15	5,17E-32	541,35	41,67
<i>AC125167,1</i>	3,12	3,11E-46	1533,67	141,84
<i>Lgals3</i>	3,10	6,97E-19	747,38	35,14
<i>Mpeg1</i>	3,09	8,80E-23	2205,83	143,04
<i>Dkk3</i>	3,01	2,78E-32	299,63	27,12

En ce qui concerne le modèle DBA/2-mdx, les données obtenues sur le cœur à 1 et 6 mois sont présentées dans la Figure 64 ainsi que la liste des 30 gènes les plus dérégulés dans le Tableau 14 (en Annexe 2 le tableau des gènes dérégulés à 1 mois).

Résultats



Résultats

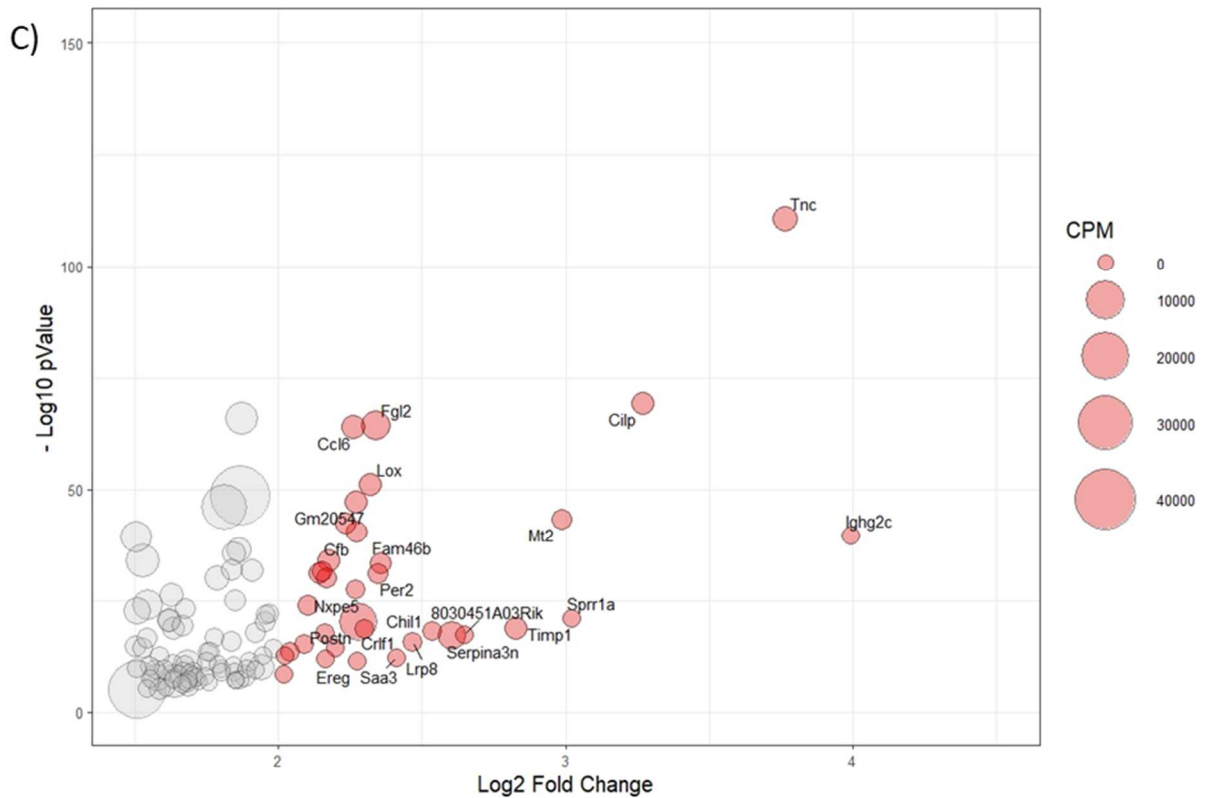


Figure 65 : Volcano Plots DBA/2-mdx.

A) Volcano plot représentant les gènes dérégulés dans le cœur du modèle DBA/2-mdx à 1 mois comparé aux souris contrôles. Log2 Fold Change en fonction de log10 pValue. B) Volcano plot représentant les gènes dérégulés dans le cœur du modèle DBA/2-mdx à 6 mois comparé aux souris contrôles. Log2 Fold Change en fonction de log10 pValue. C) Focus du Volcano plot sur les gènes dont le FC est supérieur à 2. La taille de la représentation du gène est proportionnelle au nombre de read.

Dans le modèle DBA/2-mdx à 6 mois, on retrouve dans les 5 premières positions les gènes de l'immunoglobuline *Ighg2c*, la tenascin C (*Tnc*), une protéine de la matrice extracellulaire, *Cilp* qui est également le troisième gène le plus dérégulé dans le cœur des souris DeltaMex5 à 4 mois, *Sprr1a*, une protéine stress-inductible ayant des propriétés cardioprotectrices, et enfin la métallothionéine *Mt2*. A 1 mois, le nombre de gènes dérégulés est déjà important et les gènes les plus dérégulés dépassent un log2FC de 3.

Tableau 14 : Top 30 des gènes les plus dérégulés dans le cœur du modèle DBA/2-mdx à 6 mois.
Souligné = spécifique du modèle.

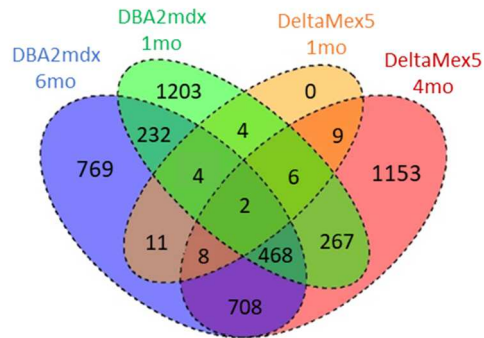
<i>Gene</i>	log2FC	padj	Moyenne DBA/2-mdx	Moyenne DBA/2
<u><i>Ighg2c</i></u>	3,99	2,34E-40	127,71	0,00
<i>Tnc</i>	3,76	1,89E-111	1637,90	96,86
<i>Cilp</i>	3,27	4,59E-70	760,53	62,18
<i>Sprr1a</i>	3,02	7,35E-22	75,33	1,37
<i>Mt2</i>	2,98	3,69E-44	425,98	39,53
<i>Timp1</i>	2,83	1,53E-19	735,88	34,09
<i>8030451A03Rik</i>	2,65	5,15E-18	77,45	4,44
<i>Serpina3n</i>	2,60	9,78E-18	2728,99	200,98
<i>Chil1</i>	2,54	1,01E-18	173,35	15,73

Résultats

<i>Hamp2</i>	-2,51	2,58E-38	61,43	427,96
<i>Lrp8</i>	2,47	1,81E-16	132,79	11,37
<i>Saa3</i>	2,41	6,08E-13	46,74	0,65
<i>Fam46b</i>	2,36	5,00E-34	511,91	83,18
<i>Per2</i>	2,35	8,14E-32	292,28	47,22
<i>Fgl2</i>	2,34	4,46E-65	3216,00	585,39
<i>Lox</i>	2,32	7,38E-52	919,81	166,22
<i>Crlf1</i>	2,30	1,98E-19	172,27	24,17
<i>Postn</i>	2,28	6,18E-21	9086,68	1378,81
<i>Ereg</i>	2,27	3,18E-12	58,87	3,76
<i>Cfb</i>	2,27	4,86E-41	632,26	115,30
<i>Nxpe5</i>	2,27	4,06E-28	215,52	36,33
<i>Gm20547</i>	2,27	6,53E-48	712,93	133,02
<i>Ccl6</i>	2,26	1,05E-64	1020,70	197,87
<i>Ccl9</i>	2,24	4,79E-43	492,52	93,30
<i>Pak3</i>	2,20	3,81E-15	117,72	15,86
<i>Mmp3</i>	2,17	7,28E-35	967,23	187,88
<i>Srpx</i>	2,17	9,38E-31	366,18	70,08
<i>Clec4d</i>	2,16	1,12E-12	66,61	7,53
<i>Ccl7</i>	2,16	2,68E-18	140,95	22,98
<i>Il33</i>	2,15	2,60E-32	353,56	69,27

La représentation en diagramme de Venn des résultats de RNAseq permet la visualisation des nombres de gènes dérégulés communs ou spécifiques d'un modèle ou d'un degré d'avancement de la pathologie (Figure 66).

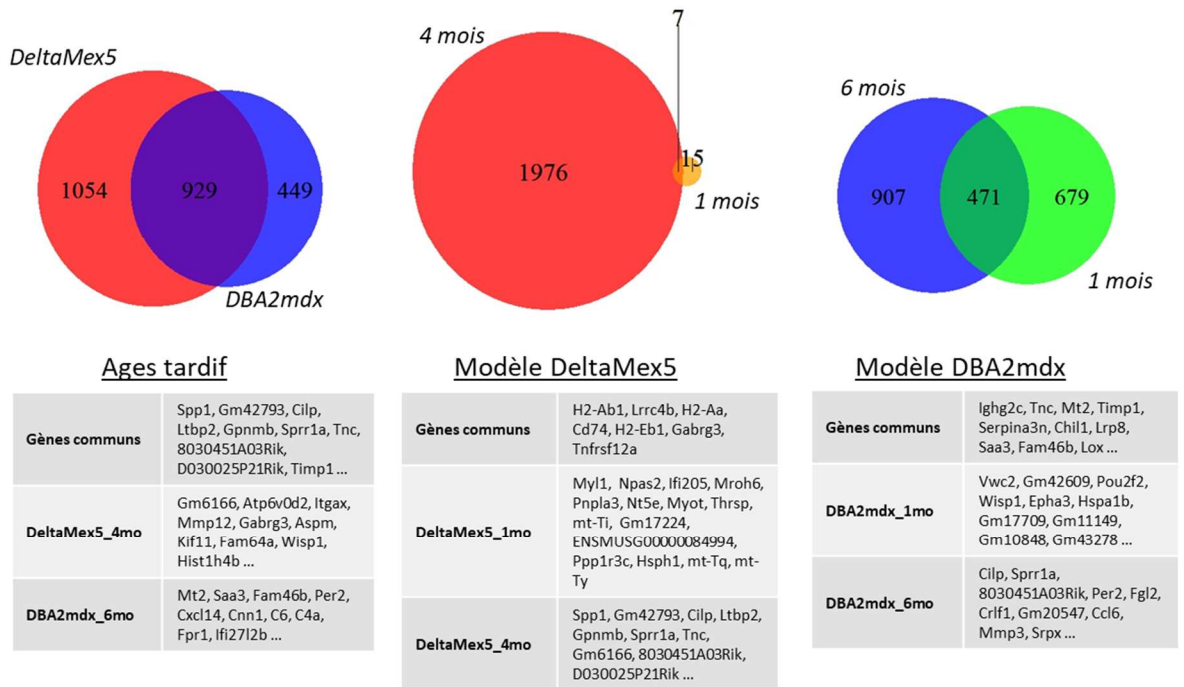
A) Diagramme de Venn des gènes dérégulés



Gènes communs	Hlf, Lrrc4b	DBA2mdx_1mo X DeltaMex5_1mo	Acta2, Myot, Ppp1r3c, ENSMUSG00000084994
DBA2mdx 6mo	Ighg2c, Ccl6, Cxcl14, 4930593A02Rik, Cnn1, C6, Tnn, C4a, Ifi2712b, Angptl4...	DBA2mdx_1mo X DBA2mdx_6mo	Mt2, Serpina3n, Chil1, Saa3, Fam46b, Ccl7, Ms4a6d, Fpr1, Slfn4, Ahsg...
DBA2mdx 1mo	Inmt, Prune2, Cdh4, Gck, Aqp8, Fbxo44, Gm43146, Tchhl1, Mal, Bdh1...	DeltaMex5_1mo X DeltaMex5_4mo	Cd74, Cdc25b, Fscn1, Gm44637, H2-Aa, H2-Ab1, H2-Eb1, Pop4, Thrsp
DeltaMex5 4mo	Gm6166, Atp6v0d2, Ccnb1, Mmp12, Hist1h2bm, Hist1h3b, Plk1, Diaph3, Aspm, Kif11...	DBA2mdx_6mo X DeltaMex5_4mo	Cilp, Ltbp2, Sprr1a, 8030451A03Rik, D030025P21Rik, Sfrp2, Ptn, Gm26771, Mpeg1, P4ha3...

Résultats

B) Diagramme de Venn des gènes Surexprimés



C) Diagramme de Venn des gènes Sous-exprimés

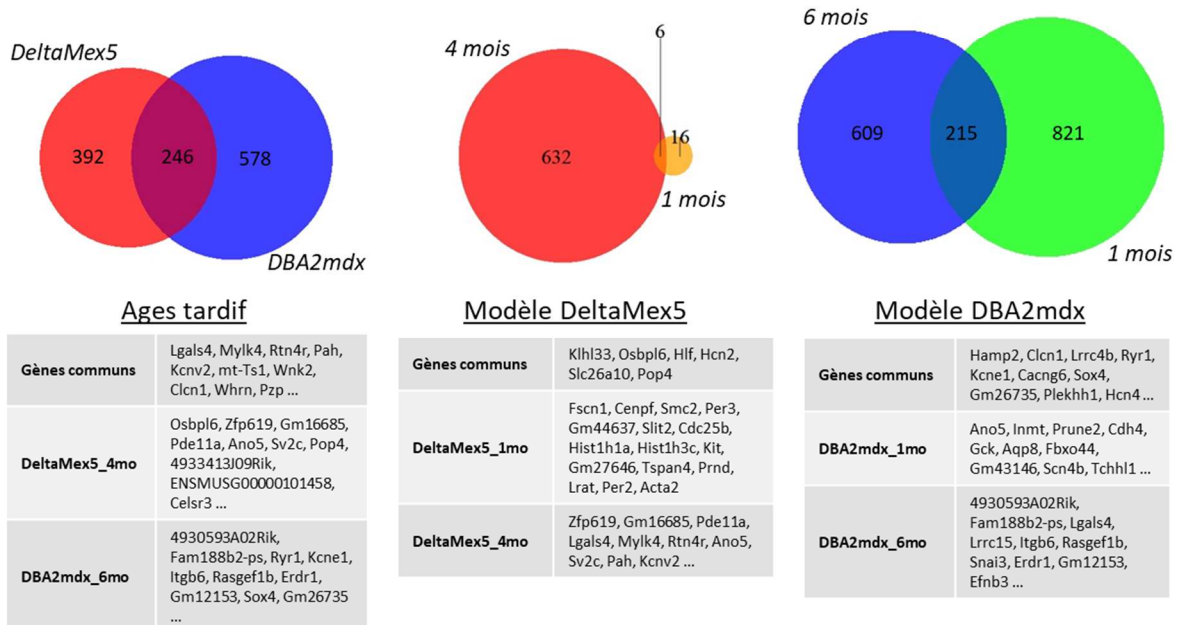


Figure 66 : Diagramme de Venn des résultats de RNAseq.

A) Diagramme de Venn représentant tous les gènes dérégulés retrouvés dans l'analyse RNAseq et liste des premiers gènes pour chaque catégorie. B) Diagramme de Venn des gènes surexprimés : entre les deux modèles à un âge avancé de l'atteinte cardiaque et entre les différents âges pour les deux modèles DeltaMex5 et DBA/2-mdx. D) Diagramme de Venn des gènes sous-exprimés dans les différentes conditions.

Sur les 46 717 gènes inclus dans l'analyse RNAseq, 4 850 gènes ressortent comme significativement dérégulés ($|\log_2FC| > 0,5$ et $pvalue < 0,05$) dans un ou l'autre des modèles à un âge

Résultats

précoce ou avancé de l'atteinte cardiaque en comparaison à son contrôle. Parmi ces gènes dérégulés, seuls 2 gènes sont communs aux 4 conditions : les gènes *Hlf* et *Lrrc4b*, et seul le gène *Hlf* est modifié dans le même sens. *Lrrc4b* code pour une protéine d'adhésion cellulaire et est importante aux niveau des synapses. *Hlf* code pour un facteur de transcription de la famille bZip. Son inactivation chez la souris donne entre autres signes, une hypertrophie cardiaque et une hypotension (Wang et al., 2010a). Dans les deux modèles, le gène *Hlf* est sous-exprimé dès 1 mois, et cette sous-expression est exacerbée dans le temps. A un âge précoce, le cœur de souris DeltaMex5 n'a que 44 gènes dérégulés, tandis que le cœur de la souris DBA/2-mdx en a déjà 2 186, dont seulement 4 gènes en commun dans les deux modèles. A un âge plus tardif, le cœur DeltaMex5 a 2 621 gènes dérégulés et le cœur DBA/2-mdx 2 202, dont 1 175 communs aux deux modèles, parmi lesquels 708 gènes sont spécifiques de l'âge avancé de la cardiomyopathie. Seulement 9 gènes sont spécifiques du modèle DeltaMex5, tandis que 232 sont spécifiques du modèle DBA/2-mdx. Parmi tous les gènes dérégulés, une plus grande part des gènes est surexprimée plutôt que sous-exprimée.

La majorité des gènes les plus surexprimés sont communs entre les deux modèles. Cependant, les gènes dérégulés dans le cœur de la souris DeltaMex5 à 4 mois le sont plus fortement que les gènes dérégulés dans le cœur des souris DBA/2-mdx à 6 mois (log₂FC maximum de 4 contre 6,6). Il est observé également que, bien que l'atteinte cardiaque entre les deux modèles soit différente, les dérégulations transcriptionnelles qui y sont liés portent majoritairement sur les mêmes gènes et voies de signalisation à un temps tardif.

Pour compléter cette analyse, le logiciel *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA, Qiagen) qui s'appuie sur un référentiel d'interactions biologiques et d'annotations fonctionnelles afin d'aider à l'interprétation des données en mécanismes biologiques a été utilisé. A l'âge d'un mois, aucune augmentation des voies de signalisation n'a été identifiée dans le cœur des souris DeltaMex5 et DBA/2-mdx. L'analyse par IPA a permis de mettre en évidence les fonctions biologiques dont les gènes sont les plus représentés dans les gènes dérégulés dans une phase avancée. En première position dans les deux modèles, plus de 150 gènes impliqués dans les maladies cardiovasculaires sont retrouvés dans l'analyse RNAseq. En deuxième position, plus de 150 gènes dérégulés sont catégorisés dans la famille des lésions et anomalies sur un organe. Enfin en troisième position, près de 200 gènes de la fonction et du développement du système cardiovasculaire sont retrouvés (Figure 67A). Nous avons également utilisé une autre fonction du logiciel IPA pour déterminer la toxicité associée avec les changements d'expression génique observée, et ce uniquement dans les phases avancées. De nombreux gènes dérégulés sont identifiés : 86 gènes associés à un élargissement cardiaque dans le modèle DeltaMex5 et 85 dans le modèle DBA/2-mdx, 45/48 gènes pouvant conduire à une dysfonction cardiaque, 38/36

Résultats

gènes dans la dilatation cardiaque, 27/28 gènes dans la fibrose cardiaque et 35/37 dans la nécrose cardiaque (Figure 67B).

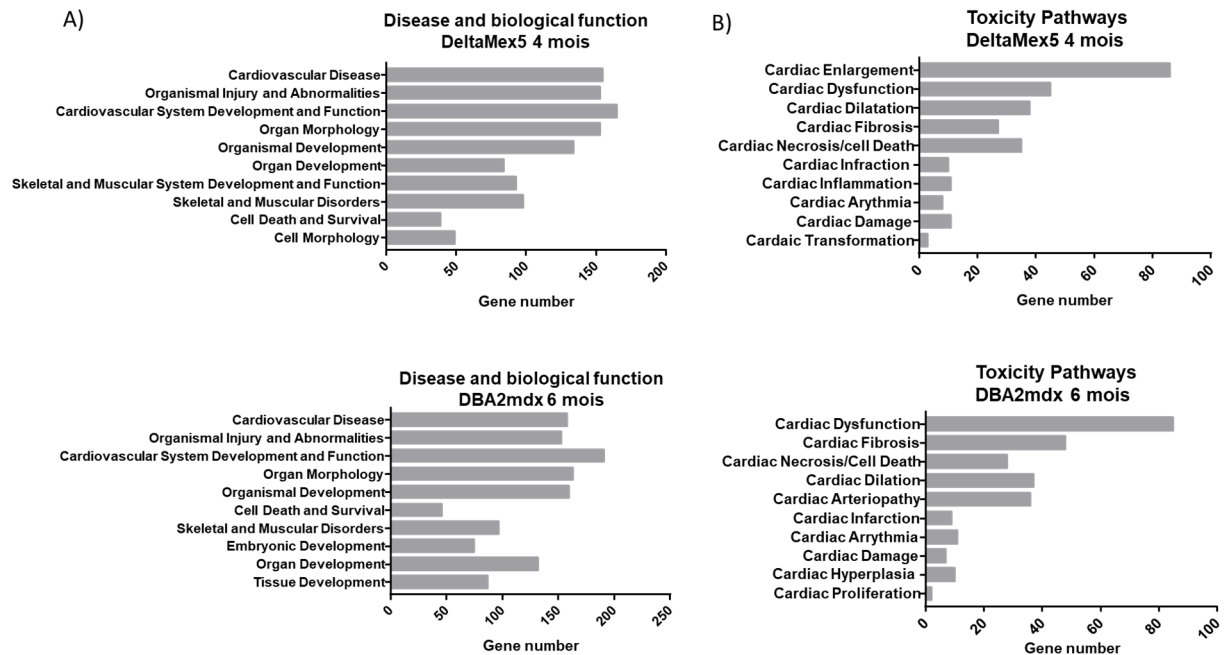


Figure 67 : Analyses des voies de signalisation avec *Ingenuity Pathway Analysis*.

A) Fonction biologiques les plus représentées. B) Voies de signalisation impliquées dans la toxicité. Les groupes sont triés selon la valeur de la Pvalue. $P < 0,05$.

Le système de classification d'ontologie génique PANTHER a également été utilisé afin de déterminer quelles étaient les voies de signalisation les plus dérégulées dans les modèles à un stade avancé de la pathologie. Dans les deux modèles, les perturbations semblent très similaires comme vu dans l'analyse des Diagrammes de Venn. Les deux premières voies retrouvées sont similaires dans les 2 modèles et comprennent la voie de signalisation de l'inflammation médiée par les chimiokines et les cytokines avec près de 70 gènes impliqués, et celle liée aux intégrines avec plus de 50 gènes impliqués. L'inflammation résulte vraisemblablement des dommages cellulaires associés à la cardiomyopathie. Les intégrines jouent un rôle majeur dans la transmission des forces mécaniques entre les membranes et l'adaptation à ces forces dans les cardiomyocytes. De façon intéressante, la voie de signalisation WNT, déjà citée plus haut en raison de l'importance des dérégulations de certains de ces membres, est retrouvée en 4^{ème} position des voies de signalisation les plus dérégulées dans le cœur des souris DeltaMex5 et en 3^{ème} position dans le cœur des souris DBA/2-mdx. Un total de 40 gènes appartenant à cette voie sont dérégulés dont *Sfrp2* et *Dkk3*. En ce qui concerne la voie TGF- β déjà mentionnée également, elle est retrouvée en 22^{ème} et 19^{ème} position, avec plus de 15 gènes dérégulés, voie à laquelle appartiennent *Cilp* et *Ltbp2*, deux des gènes les plus surexprimés. Parmi les autres voies canoniques qui ne sont pas représentées sur le graphique, les voies les plus diminuées dans les modèles sont la phosphorylation oxydative et de la fonction mitochondriale, avec une diminution de

Résultats

facteurs dans chacun des 5 complexes mitochondriaux de la chaîne respiratoire. On retrouve également la voie du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR γ) qui a un rôle dans le métabolisme cardiaque.

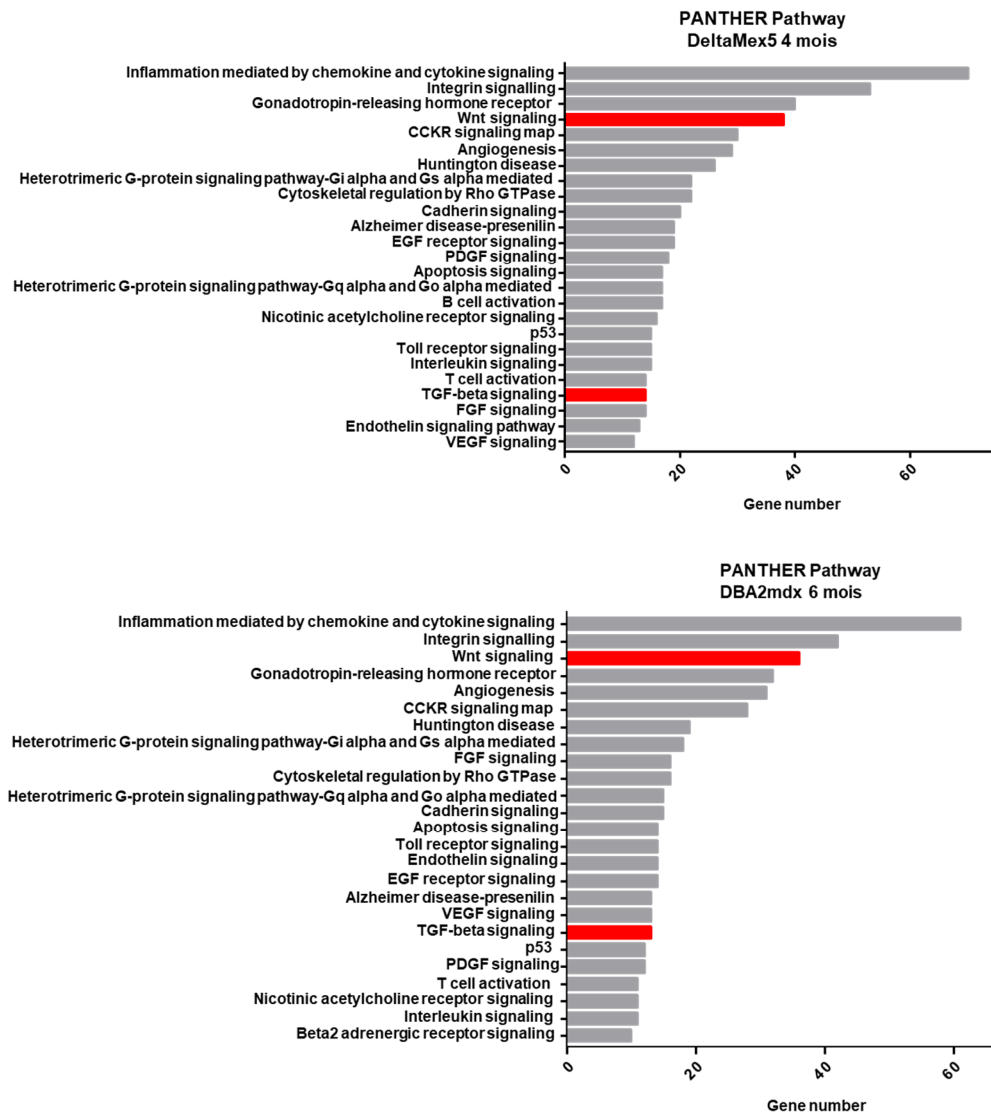


Figure 68 : Analyse des voies de signalisation avec PANTHER dans le cœur des souris DeltaMex5 et DBA/2-mdx à 4 et 6 mois.

Les groupes sont triés selon la valeur de la Pvalue. $P < 0,05$.

La voie WNT est essentielle au développement du cœur et à sa régénération (Gessert and Kühl, 2010). Alors que dans un cœur sain, la voie WNT est quiescente, elle peut être réactivée en réponse à un dommage cardiaque (Hermans et al., 2012). Elle a notamment été montrée comme impliquée dans l'apparition de la fibrose cardiaque et dans l'activation et la prolifération des cardiofibroblastes en réponse à un dommage du cœur (Duan et al., 2012) (Tao et al., 2016). La voie WNT module un large panel de réponses cellulaires. Elle possède trois sous-voies : la voie canonique et les voies non canoniques. Toutes trois sont activées par la liaison de différentes glycoprotéines secrétées à la famille des récepteurs frizzled, pour transduire une cascade de signalisation à partir de la protéine Dishevelled

(Dvl) dans la cellule (Figure 69). La voie canonique a pour effecteur la β -caténine. En l'absence de ligand, la β -caténine accumulée dans le cytoplasme est dégradée par un complexe constitué de la glycogène synthase kinase 3 β (GSK-3 β), la protéine APC (adenomatous polyposis coli) et la caséine kinase (CK)-1 α . Lors de la liaison d'une des protéines Wnt à son récepteur Frizzled (Fz) et au corécepteur lipoprotéique (LRP5/6), la β -caténine cytoplasmique est stabilisée et transloque dans le noyau où elle interagit avec le facteur de transcription TCF/LEF pour réguler ses gènes cibles (Rao and Kuhl, 2010).

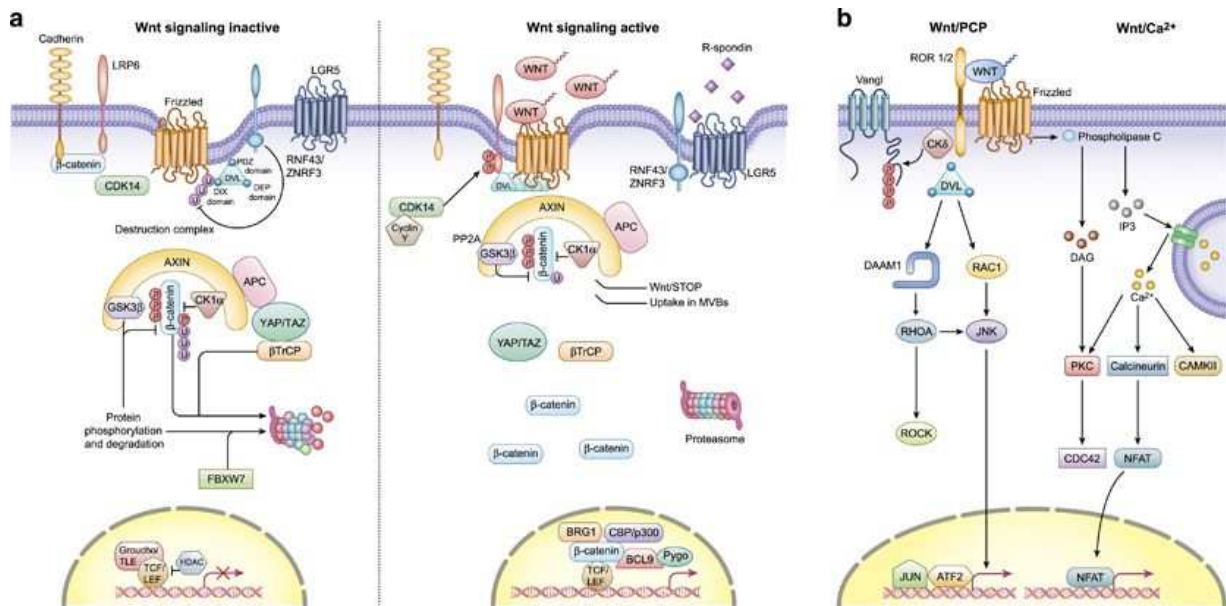


Figure 69 : Les différentes voies de signalisation WNT.

A) La voie de signalisation WNT canonique sous sa forme inactivée et activée. B) Les voies de signalisation WNT non canoniques : la voie WNT/PCP et la voie WNT dépendante du calcium (Zhan et al., 2017)

La voie TGF- β est composée de trois cytokines de structure similaires : TGF- β 1, 2 et 3 et de récepteurs transmembranaires. Elle active principalement la voie Smad, mais également les voies Erk, JNK, p38 MAPK et GTPase (Umbarkar et al., 2019). Les cytokines TGF- β sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires, comme l'inflammation, la prolifération cellulaire et la différenciation. Plus particulièrement dans les cœurs malades, l'activation de TGF- β 1 entraîne la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire, ainsi que l'inhibition de la destruction de cette dernière (Liu et al., 2019) (Hanna and Frangogiannis, 2019). Les patients atteints de cardiomyopathie dilatée présentent une augmentation de l'expression de TGF- β 1 et 2 (Pauschinger et al., 1999) (Sanderson et al.) et les niveaux de TGF- β sont corrélés avec le développement de la fibrose cardiaque (Hein et al., 2003).

Ces deux voies sont impliquées dans la fibrose cardiaque, et ont été reliées entre elles par plusieurs études. En effet, dans les pathologies cardiaques, TGF- β active la signalisation

WNT/ β caténine, qui à son tour stabilise la réponse TGF- β /Smad. Il existe un circuit de transactivation TGF- β / Wnt dans les fibroblastes cardiaques (Dzialo et al., 2018) (Seo et al., 2019) et il semble que la co-activation de ces deux voies est nécessaire pour déclencher une réponse fibrotique efficace. Wnt3a induit la différenciation des fibroblastes embryonnaires de souris en myofibroblastes de façon dépendante du TGF- β et de la β -caténine (Carthy et al., 2011). Le TGF- β a été impliqué dans la production et la sécrétion des protéines WNT par une voie dépendante de la voie de la TGF- β kinase 1 activée (TAK1) dans les fibroblastes cardiaques et dans les cellules inflammatoires cardiaques (Blyszczuk et al., 2017). De plus, la voie PI3K/Akt, inductible par TGF- β , a également été signalée comme inhibant l'activité de GSK-3 β , une enzyme impliquée dans la dégradation de la β -caténine, dans les fibroblastes cardiaques (Ma et al., 2017). A contrario, la voie PPAR γ qui prévient la fibrose est contrôlée de manière négative par la voie TGF- β (Vallee et al., 2018). La régulation négative de PPAR γ renforcée par des ligands WNT peut être réalisée par des voies non canoniques à travers CaMKII-TAK1-NLK-TAB 2 qui inhibe la transactivation de PPAR γ . Les ligands PPAR γ entraînent une diminution du TGF- β 1 par la signalisation PI3K / AKT (Kulkarni et al., 2011).

III.B. Validation des gènes dérégulés

La dérégulation de plusieurs gènes parmi les plus dérégulés a été évaluée dans les différentes conditions. Ces gènes ont été choisis pour leur potentiel rôle dans la pathologie cardiaque. *Cilp* et *Ltbp2* appartiennent à la voie TGF- β , tandis que *Dkk3*, *Sfrp2* et *Wisp2* appartiennent à la voie WNT, les deux voies que nous avons identifiées précédemment. *Nppa* est un marqueur sérique d'une atteinte cardiaque (Song et al., 2015), précédemment décrit dans la thèse. *Dio2* et *Timp1* auraient un rôle négatif dans les DCM. En effet, *Dio2* qui code pour la deiodinase iodothyronine type 2 a été décrit comme surexprimé dans le cœur d'un modèle murin de DCM, l'hyperthyroïdisme induit par la surexpression de Dio-2 y joue un rôle dans le remodelage hypertrophique (Wang et al., 2010b). *Timp1*, que nous avons également déjà décrit, a un rôle pro-fibrotique en inhibant la dégradation de la matrice extracellulaire, ainsi que pro-hypertrophique (Bironaite et al., 2015). *C2orf40*, un gène suppresseur de tumeur, principalement décrit dans le cancer de l'œsophage a récemment été suggéré comme ayant un rôle dans la fibrillation atriale (Huang et al., 2017). Tandis que *Thsb4* et *Comp* auraient un effet protecteur dans les cardiomyopathies. La surexpression de *Thsb4*, qui code pour la thrombospondine 4, en réponse à un stress du réticulum endoplasmique a démontré un rôle protecteur contre l'agrégation des protéines dans les cardiomyopathies (Lynch et al., 2012). La déficience en *Comp*, qui code pour la protéine de matrice oligomérique du cartilage, cause une DCM de par son rôle de stabilisation des cardiomyocytes (Huang et al., 2013).

Résultats

Aucun de ces gènes n'est surexprimé dans le modèle DeltaMex5 à 1 mois, tandis que *Dkk3*, *Thsb4* et *Timp1* sont déjà surexprimés dans le modèle DBA2-mdx. Tous les gènes sont surexprimés à l'âge plus avancé de la pathologie (Tableau 15).

Tableau 15 : Dérégulation de plusieurs gènes d'intérêt dans les modèles.

		<i>C2orf40</i>	<i>Cilp</i>	<i>Comp</i>	<i>Dio2</i>	<i>Dkk3</i>	<i>Ltbp2</i>
Delta Mex5 1mois	log2FC	0,12	0,16	0,09	0,22	0,11	0,11
	padj	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	8,97E-01	0,00E+00	0,00E+00
	Moyenne DeltaMex5	18	560	106	60	180	388
	Moyenne C57BL/6	7	136	41	33	49	91
Delta Mex5 4 mois	log2FC	1,60	4,77	2,94	2,03	3,01	4,74
	Padj	4,08E-05	4,70E-278	4,48E-15	1,08E-13	2,80E-32	3,00E-174
	Moyenne DeltaMex5	32	3357	990	130	300	2206
	Moyenne C57BL/6	6	110	37	25	27	68
DBA/2 -mdx 1mois	log2FC	1,28	0,63	0,73	0,58	1,06	0,79
	padj	0,01	2,30E-01	1,37E-01	2,64E-01	2,10E-02	9,00E-02
	Moyenne DBA/2-mdx	80	417	211	68	936	1559
	Moyenne DBA/2	10	111	35	38	53	160
DBA/2 -mdx 6mois	log2FC	1,19	3,27	1,59	1,49	1,37	1,94
	padj	1,14E-03	4,60E-70	7,35E-06	9,85E-08	1,60E-04	1,00E-10
	Moyenne DBA/2-mdx	47	761	558	123	542	1688
	Moyenne DBA/2	12	62	49	33	75	266

		<i>Nppa</i>	<i>Sfrp2</i>	<i>Thsb4</i>	<i>Timp1</i>	<i>Wisp2</i>
Delta Mex5 1mois	log2FC	0,03	0,11	0,10	0,09	0,27
	padj	1,00E+00	1,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	8,60E-01
	Moyenne DeltaMex5	2152	91	227	54	79
	Moyenne C57BL/6	1454	52	74	24	53
Delta Mex5 4 mois	log2FC	2,41	3,62	3,61	3,98	1,68
	Padj	3,33E-144	2,10E-55	3,79E-121	5,70E-52	1,90E-11
	Moyenne DeltaMex5	10890	501	920	626	371
	Moyenne C57BL/6	1989	30	67	24	100
DBA/2 -mdx 1mois	log2FC	0,61	0,81	1,35	2,08	0,49
	padj	0,00E+00	8,50E-02	0,00	0,00	0,37
	Moyenne DBA/2-mdx	16008	378	463	269	262
	Moyenne DBA/2	3600	43	136	34	86
DBA/2 -mdx 6mois	log2FC	1,51	1,76	1,39	2,83	1,85
	padj	6,33E-06	2,90E-14	2,21E-12	1,53E-19	1,00E-25
	Moyenne DBA/2-mdx	33841	250	622	736	529
	Moyenne DBA/2	6960	61	214	34	132

Résultats

La validation de ces données de RNAseq a ensuite été effectuée sur des cœurs du modèle DeltaMex5 à différents âges (2, 4 et 6 mois) par une qPCR individuelle pour confirmer leur surexpression et évaluer leur modification au cours du temps. Tous les gènes ont une tendance à la surexpression dès 2 mois dans le modèle et la surexpression des gènes augmente progressivement avec l'âge (Figure 70).

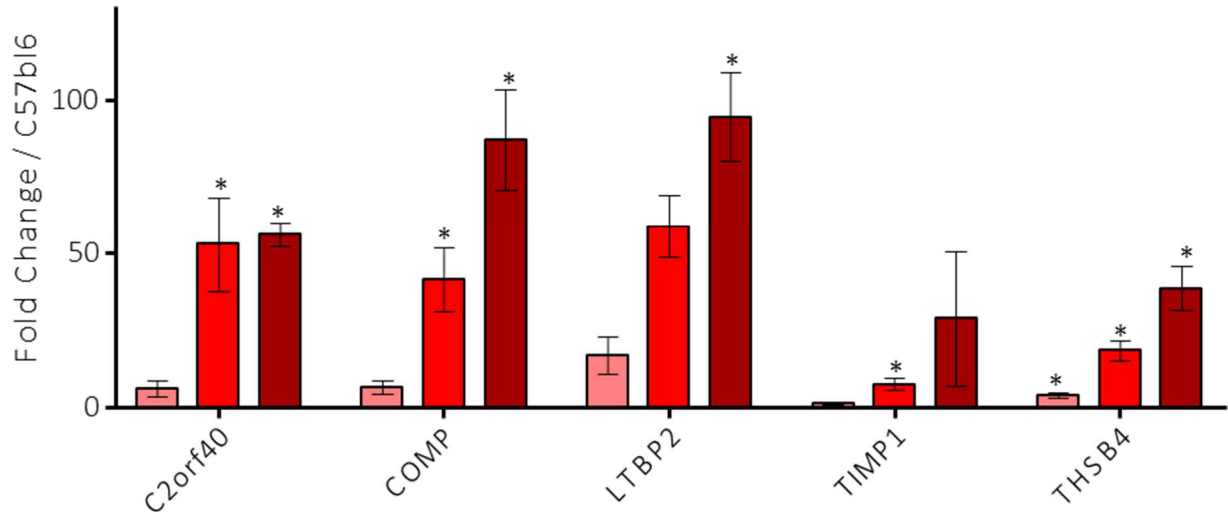
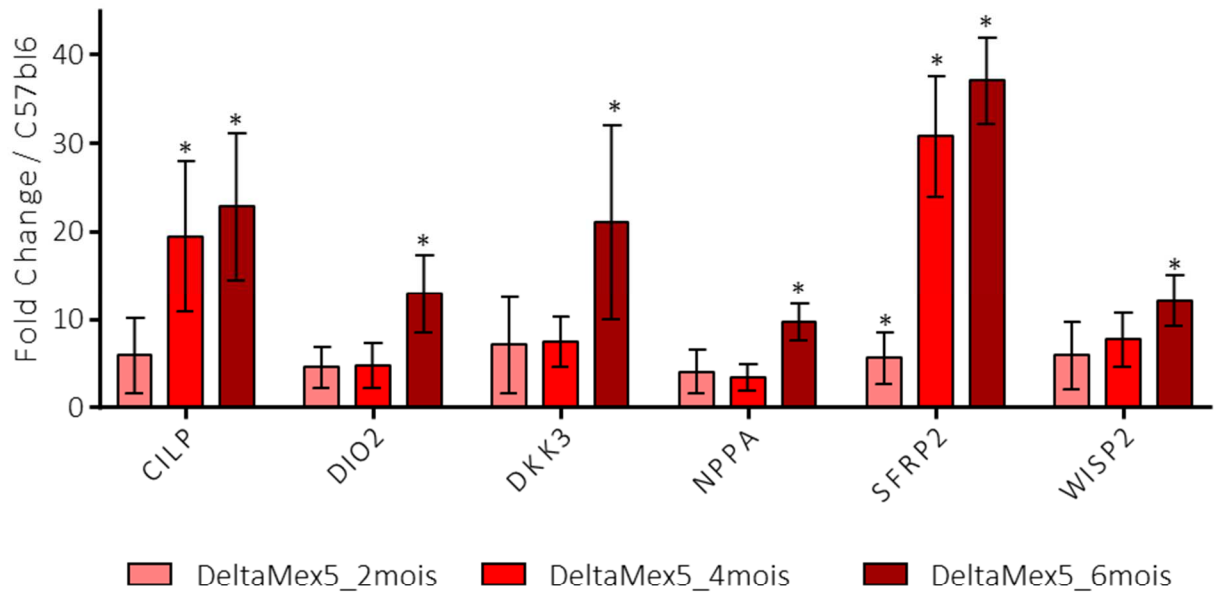


Figure 70 : Analyse de qPCR de plusieurs gènes dérégulés dans le RNAseq.
n= 4 par groupe. Test de Mann-Whitney.

IV. Quatrième partie : Modulation des voies de signalisation WNT et TGF- β et des gènes candidats

Nous avons ensuite voulu évaluer quel était l'impact de la modulation de ces voies de signalisation sur le phénotype cardiaque du modèle. Notre première approche a été d'utiliser une combinaison de 2 molécules, inhibitrices de chacune des 2 voies. Une évaluation des conséquences du traitement combiné in vivo sur l'état fibrotique et la fonction cardiaque a été réalisée sur le modèle DeltaMex5 (modèle le plus sévère des deux). Ensuite, nous avons réalisé des études par transfert de gène. Après une validation in vitro et in vivo du vecteur considéré, une évaluation des conséquences du transfert de gène in vivo sur l'état fibrotique et la fonction cardiaque a été réalisée, également sur le modèle DeltaMex5. L'effet de vecteurs exprimant les gènes humains *CILP* pour la voie TGF- β et *WISP2*, *SFRP2* et *DKK3*, pour la voie WNT a été testé (la taille du cDNA *Ltbp2* (5,5 kb) dépasse les capacités d'insertion dans un AAV) ainsi que des vecteurs d'inhibition par shRNA pour *Cilp*, *Ltbp2* et *Wisp2*. Nous avons rajouté dans cette analyse le transfert du gène de *Nrf2* et des microARN miR-101a, miR-133a, miR-384-5p et miR-590 pour leurs potentiels rôles bénéfiques de régulation de l'atteinte cardiaque tels que décrit dans la littérature. A noter que l'ensemble des analyses n'ont pas encore été effectuées à ce jour pour certaines conditions. Les approches ayant montré un intérêt dans le modèle DeltaMex5 sont en cours d'être appliquées sur le modèle DBA/2-mdx afin de définir si les approches peuvent être généralisées et donc représenter une piste pour des approches génériques de la cardiomyopathie.

IV.A. Inhibiteurs pharmacologiques des voies WNT et TGF- β

Nous avons voulu évaluer l'effet d'une combinaison d'inhibiteurs pharmacologiques des deux voies d'intérêt. Le SB431542 est un inhibiteur de la voie TGF- β , plus spécifiquement de la famille des *activin receptor-like kinase* (ALK) : ALK4, ALK5 et ALK7, les récepteurs de TGF- β 1 (Inman et al., 2002). L'utilisation de SB431542 a montré un effet cardio-protecteur dans un modèle murin d'infection par *Trypanosoma cruzi* (Waghabi et al., 2009). XAV939 inhibe la signalisation WNT via la stabilisation de l'axine par l'inhibition des enzymes tankyrase 1 et 2, entraînant une dégradation de la β -caténine et donc l'inhibition de la transcription médiée par cette dernière (Huang et al., 2009). L'efficacité anti-fibrotique de XAV939 a été montrée sur un modèle murin de fibrose cutanée (Distler et al., 2013). Les voies WNT et TGF- β jouant un rôle important dans l'activation des fibroblastes, l'association des inhibiteurs de WNT et de TGF- β , XAV939 et SB431542, a été démontrée comme pouvant augmenter

la reprogrammation des cardiomyocytes et la maturation de ces derniers en présence de facteurs de transcription (Gata4, Mef2c et Tbx5) (Mohamed et al., 2017; Sadahiro and Ieda, 2020).

Le traitement consiste en une injection intrapéritonéale de SB431542 (10 mg/kg) et de XAV939 (2,5 mg/kg) (Mohamed et al., 2017 707), 3 fois par semaine pendant 3 mois. Les injections sont débutées à 1 mois, avant l'apparition de l'atteinte cardiaque, jusqu'à 4 mois après les mesures échographiques. Les conséquences sur le cœur au niveau global, histologique et fonctionnel ont été étudiées.

IV.A.1. Evaluation morphologique

La masse des souris est significativement diminuée chez les souris traitées par la combinaison de SB431542 et XAV939 après 3 mois ($27,93 \pm 1,27$ g, $n=4$, versus $34,9 \pm 1,3$ g, $n=8$, $P = 0,0101$) et est revenue à une valeur normale comme montré par l'absence de différence avec les souris contrôle C57BL/6 ($28,81 \pm 0,72$, $n=11$, $P > 0,05$) (Figure 71). Le ratio de la masse du cœur sur la masse totale de la souris n'est pas significativement différent entre les trois groupes, mais on observe tout de même une nette tendance à la diminution de la proportion du cœur chez les souris contrôle C57BL/6 ($0,57 \pm 0,02$ %, $n=7$) et les souris DeltaMex5 injectées ($0,55 \pm 0,04$ %, $n=4$) en comparaison des souris DeltaMex5 non traitées ($0,63 \pm 0,02$ %, $n=8$) (Figure 71).

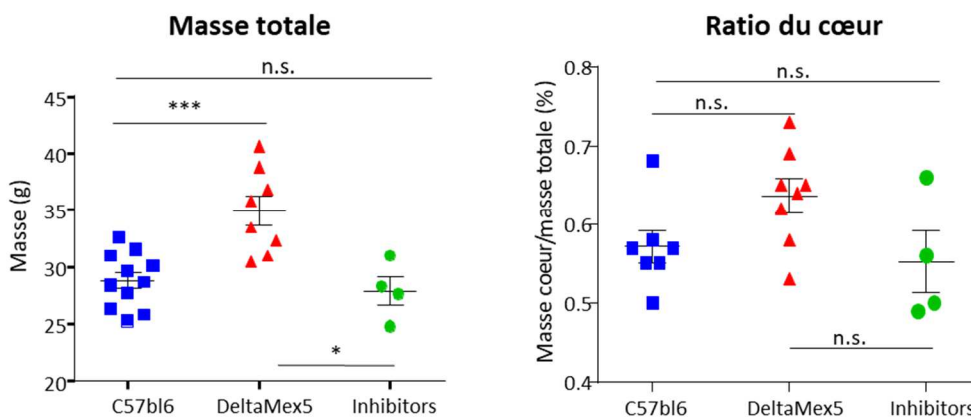


Figure 71 : Masse totale des souris en fonction du groupe et ratio de la masse du cœur en fonction de la masse totale de la souris (%).

Test de Mann-Whitney.

Des analyses histologiques ont ensuite été effectuées sur le cœur des souris. La coloration HPS révèle une persistance de tissu lésé, visible par les larges aires de tissus abimés chez les souris traitées (Figure 72A). La coloration au Rouge Sirius démontre la présence de tissu fibrotique dans le cœur des souris traitées, répartis sur toute la coupe (Figure 72B). La quantification de la fibrose totale dans les tissus par la coloration du collagène au Rouge Sirius montre que le taux de fibrose ne diminue pas chez

Résultats

les souris DeltaMex5 traitées en comparaison des souris DeltaMex5 (21,87 ± 2,48 % versus 18,68 ± 1,74 %, $P > 0.05$, $n=4$) (Figure 72C).

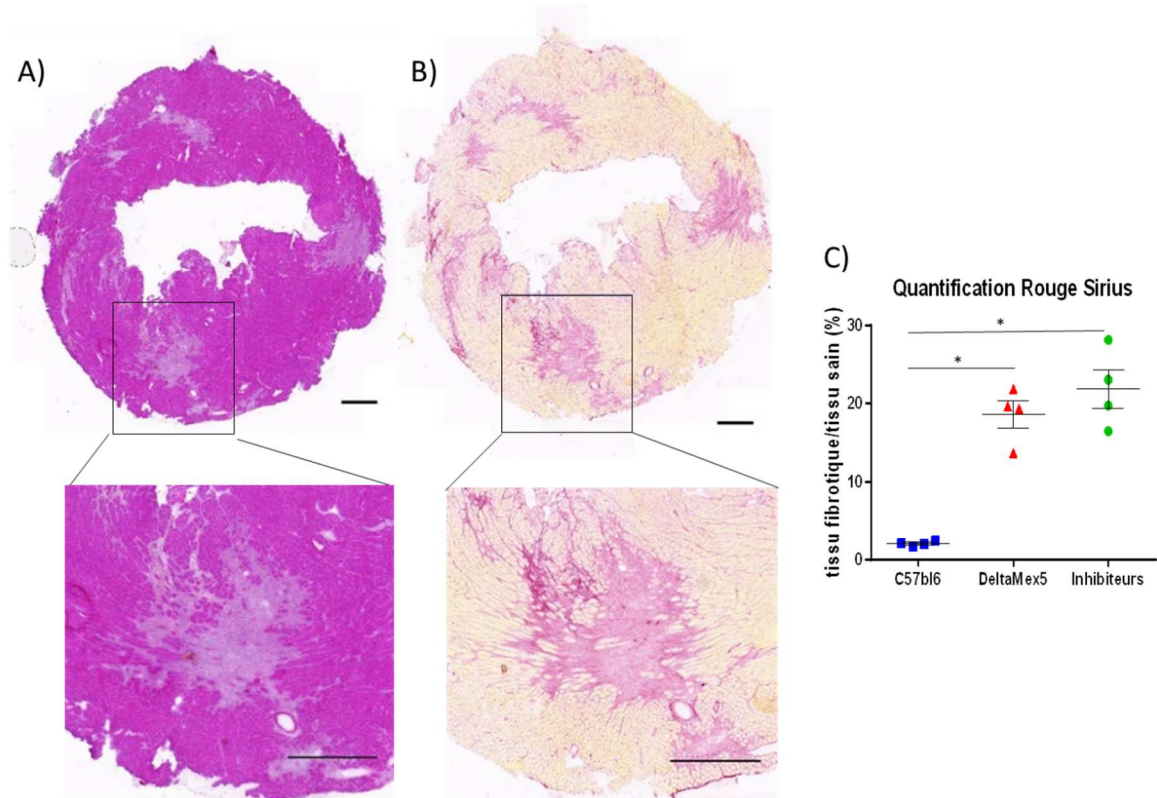


Figure 72 : Caractérisation histologique du cœur après traitement par de SB431542 et XAV939 des souris DeltaMex5.

A) Coloration en HPS du cœur. B) Coloration en rouge Sirius du cœur. Echelle, 500 µm. C) Quantification de la proportion de rouge Sirius comparée au tissu sain. Test de Mann-Whitney.

IV.A.2. Evaluation fonctionnelle

Des analyses par échographie de la fonction cardiaque ont été effectuées à 4 mois, après 3 mois de traitement par les inhibiteurs combinés (Figure 73). La dilatation du ventricule gauche est améliorée. En effet le diamètre du ventricule gauche en diastole chez les souris DeltaMex5 traitées par les inhibiteurs est diminué de 0,63 mm en comparaison des souris DeltaMex5 non traitées ($4,20 \pm 0,02$ mm, $n=4$ versus $4,83 \pm 0,22$ mm, $n = 8$), et n'est plus significativement différent des souris C57BL/6 ($4,28 \pm 0,09$ mm, $n=11$, $P > 0,05$). Le volume du ventricule gauche en diastole est également diminué de plus de 30 µl ($78,47 \pm 0,774$ µl, $n=4$ versus $111,4 \pm 10,67$ µl, $n=8$) et n'est plus différent des souris C57BL/6 ($82,66 \pm 3,923$, $n=11$, $P > 0,05$). Les mêmes paramètres en systole sont également améliorés. L'hypertrophie du cœur est également réduite, la masse du ventricule gauche est ainsi diminuée de 40 % ($131,6 \pm 14,52$ mg, $n=4$, versus $190 \pm 12,77$ mg, $n=8$, $P < 0.05$). Enfin, la fonction du muscle cardiaque est également améliorée par le traitement. La fraction d'éjection cardiaque augmente de 9 % chez les souris traitées (50 ± 4 % versus 41 ± 5 %, $n=4$ et 8) et devient similaire à la fraction d'éjection des souris

Résultats

C57BL/6 ($53 \pm 3 \%$, $n=11$, $P > 0,05$). En conclusion, la condition cardiaque des souris est améliorée au niveau de la fonction du ventricule gauche et de sa dilatation, bien que la fibrose du cœur ne soit pas diminuée.

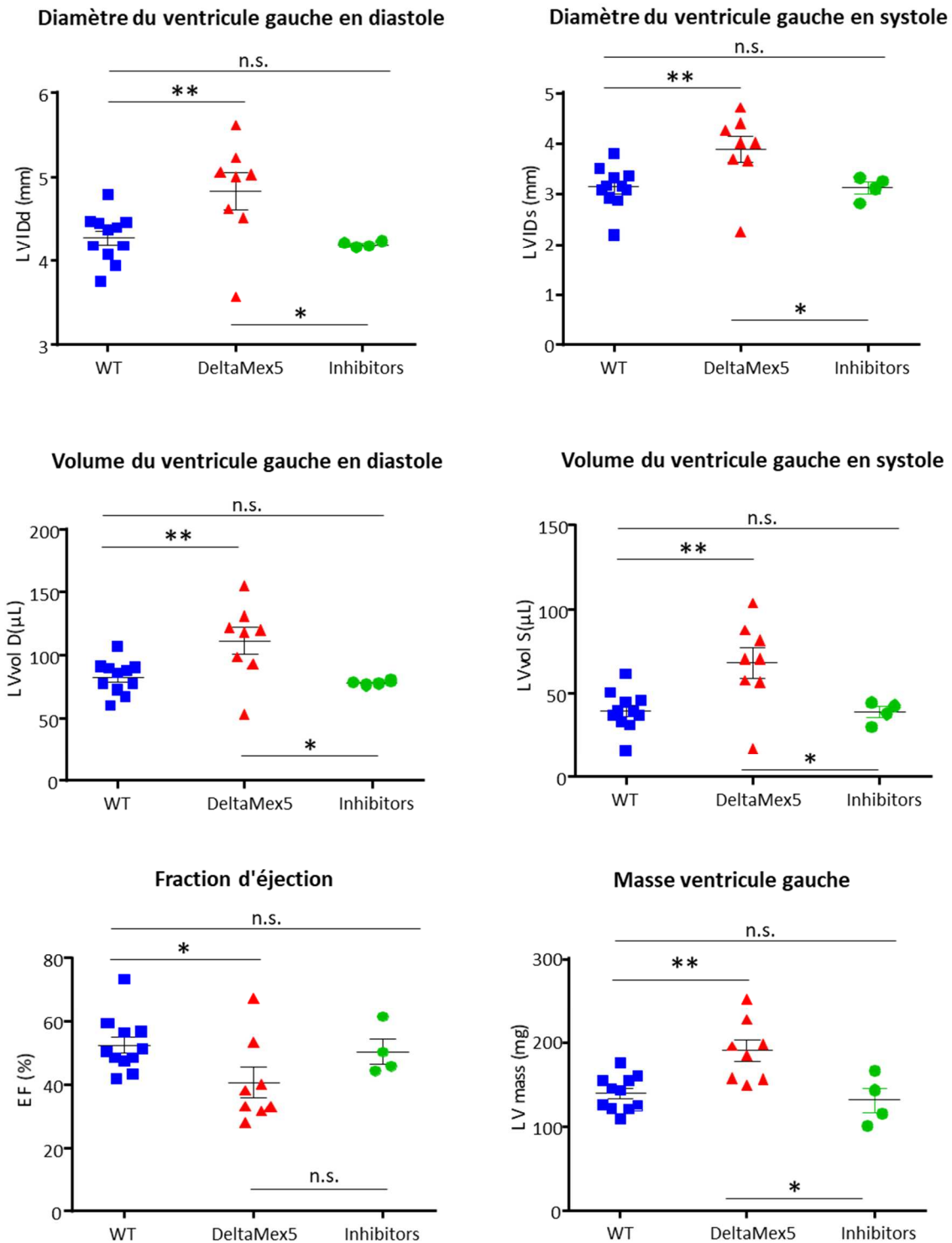


Figure 73 : Comparaison des principaux paramètres mesurés en échographie entre les souris C57BL/6, les souris DeltaMex5 non injectées et les souris DeltaMex5 traitées par les inhibiteurs à 4 mois. Test de Mann-Whitney.

IV.A.3. Evaluation moléculaire

Afin de déterminer l'efficacité des inhibiteurs sur les voies TGF- β et WNT, nous avons utilisé un kit de criblage par RT-PCR sur plaques (RT2-profiler array) d'un ensemble de 84 gènes cibles des voies WNT et TGF- β sur les échantillons des souris traitées.

La dérégulation des deux voies de signalisation a été vérifiée dans le modèles DeltaMex5 à l'âge de 4 mois. Parmi les cibles de la voie WNT incluses dans le test, 27 gènes sont surexprimés, et 23 gènes sont surexprimés parmi les cibles de la voie TGF- β (Tableau 16 et Tableau 17).

Tableau 16 : RT2 profiler PCR array WNT targets. DeltaMex5 versus C57BL6.

Gene name	Description	Fold Change	pValue
<i>Birc5</i>	Baculoviral IAP repeat-containing 5	26,31	0,010313
<i>Wisp1</i>	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	22,35	0,000121
<i>Fn1</i>	Fibronectin 1	17,3	0,000006
<i>Ctgf</i>	Connective tissue growth factor	12,82	0,003929
<i>Sfrp2</i>	Secreted frizzled-related protein 2	11,31	0,003575
<i>Fst</i>	Follistatin	7,75	0,008158
<i>Igf1</i>	Insulin-like growth factor 1	6,87	0,001707
<i>Runx2</i>	Runt related transcription factor 2	6,63	0,008201
<i>Cd44</i>	CD44 antigen	6,24	0,000516
<i>Id2</i>	Inhibitor of DNA binding 2	5,05	0,003791
<i>Nrcam</i>	Neuron-glia-CAM-related cell adhesion molecule	4,87	0,012216
<i>Wisp2</i>	WNT1 inducible signaling pathway protein 2	4,86	0,000836
<i>Sox9</i>	SRY-box containing gene 9	4,82	0,000019
<i>Ptgs2</i>	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	4,8	0,011339
<i>Twist1</i>	Twist homolog 1 (Drosophila)	4,7	0,00059
<i>Myc</i>	Myelocytomatosis oncogene	4,5	0,01456
<i>Klf5</i>	Kruppel-like factor 5	4,19	0,007077
<i>Tgfb3</i>	Transforming growth factor, beta 3	3,98	0,000079
<i>Mmp9</i>	Matrix metalloproteinase 9	3,27	0,000048
<i>Plaur</i>	Plasminogen activator, urokinase receptor	3,15	0,026848
<i>Antxr1</i>	Anthrax toxin receptor 1	3,11	0,002419
<i>Met</i>	Met proto-oncogene	2,99	0,046874
<i>Fosl1</i>	Fos-like antigen 1	2,86	0,00319
<i>Dab2</i>	Disabled homolog 2 (Drosophila)	2,75	0,003617
<i>Lrp1</i>	Low density lipoprotein receptor-related protein 1	2,23	0,023004
<i>Gja1</i>	Gap junction protein, alpha 1	1,75	0,036962
<i>Cdon</i>	Cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes	1,73	0,034154
<i>Jag1</i>	Jagged 1	1,48	0,039837
<i>Fgf9</i>	Fibroblast growth factor 9	0,56	0,047998
<i>Abcb1a</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A	0,56	0,004282

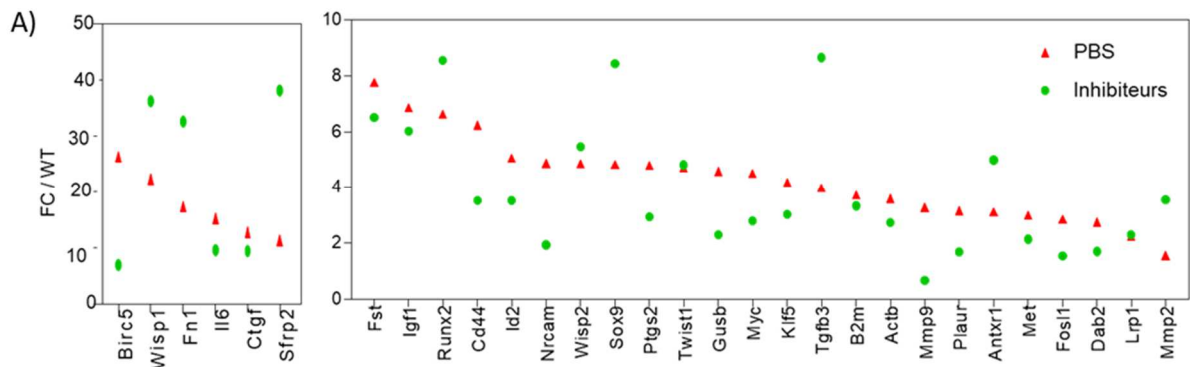
Sur les 30 gènes cibles de la voie WNT surexprimés dans le cœur du modèle DeltaMex5 comparés au cœur des contrôles C57BL/6, 19 gènes voient leur expression diminuer dans le cœur des souris traitées, 3 gènes ne sont pas changés et 9 gènes sont plus exprimés après traitement (Figure 74A). Sur les 25 gènes cibles de la voie TGF- β surexprimés dans le cœur du modèle DeltaMex5

Résultats

comparés au cœur des contrôles C57BL/6, 16 gènes voient leur expression diminuer dans le cœur des souris traitées, 3 gènes ne sont pas changés et 6 gènes sont plus exprimés après traitement (Figure 74B). La plupart des gènes cibles des voies WNT et TGF- β sont diminués chez les souris traitées avec SB431542 et XAV939.

Tableau 17 : RT2 profiler PCR array TGF- β targets.

Gene name	Description	Fold Change	pValue
<i>Hmox1</i>	Heme oxygenase (decycling) 1	20,75	0,000919
<i>Fn1</i>	Fibronectin 1	16,14	0,000001
<i>Thbs1</i>	Thrombospondin 1	10,82	0,00013
<i>Il10</i>	Interleukin 10	9,95	0,005238
<i>Runx1</i>	Runt related transcription factor 1	6,89	0,000026
<i>Tgfb2</i>	Transforming growth factor, beta 2	6,44	0,000332
<i>Ptgs2</i>	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	5,95	0,000936
<i>Emp1</i>	Epithelial membrane protein 1	5,82	0,000147
<i>Cdc6</i>	Cell division cycle 6 homolog (S, cerevisiae)	5,51	0,000369
<i>Myc</i>	Myelocytomatosis oncogene	4,68	0,001563
<i>Ephb2</i>	Eph receptor B2	4,53	0,002559
<i>Serpine1</i>	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	3,88	0,027713
<i>Id2</i>	Inhibitor of DNA binding 2	3,88	0,004991
<i>S100a8</i>	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	3,78	0,027491
<i>Rb1</i>	Retinoblastoma-like 1 (p107)	3,38	0,000469
<i>Atf3</i>	Activating transcription factor 3	3,36	0,000033
<i>Ptk2b</i>	PTK2 protein tyrosine kinase 2 beta	2,98	0,044838
<i>Gadd45b</i>	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	2,86	0,010536
<i>Acta2</i>	Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	2,46	0,000004
<i>Nfkbia</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	2,11	0,006975
<i>Rhoa</i>	Ras homolog gene family, member A	1,67	0,014847
<i>Tgfb2</i>	Transforming growth factor, beta receptor II	1,67	0,012561
<i>Smad1</i>	MAD homolog 1 (Drosophila)	1,59	0,048505
<i>Mbd1</i>	Methyl-CpG binding domain protein 1	0,61	0,036206
<i>Hey1</i>	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	0,59	0,02631
<i>Ppara</i>	Peroxisome proliferator activated receptor alpha	0,49	0,047914



Résultats

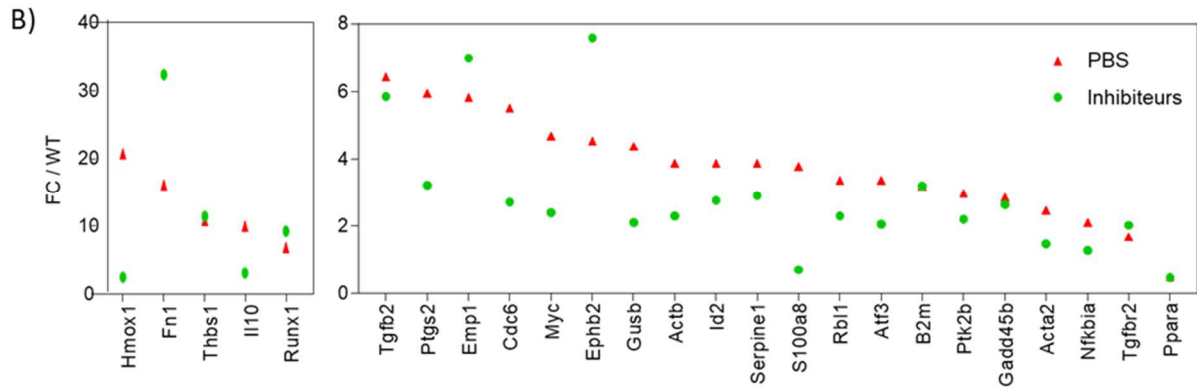


Figure 74 : Analyse RT2 profiler PCR array sur les souris traitées pas les inhibiteurs pharmacologiques. A) Comparaison de l'expression ARN des différentes cibles de la voie WNT. B) Comparaison de l'expression ARN des différentes cibles de la voie TGF- β entre les souris DeltaMex5 non traitées et les souris DeltaMex5 traitées en fold change par rapport aux niveaux d'expression chez les souris C57BL/6.

IV.A.4. Conclusion

L'utilisation concomitante d'inhibiteurs pharmacologiques des voies WNT et TGF- β dans notre modèle a montré une amélioration significative de la fonction cardiaque, de la dilatation du ventricule gauche et de la masse de la souris et de l'hypertrophie du ventricule gauche. En revanche, la fibrose cardiaque n'est pas diminuée par le traitement. La poursuite des conséquences moléculaires sur les voies par la combinaison des inhibiteurs devrait à terme permettre de mieux comprendre le mécanisme biologique de l'effet sur la fonction cardiaque.

IV.B. Approches par transfert de gène

IV.B.1. Sélection des candidats

Nous avons ensuite choisi d'étudier la modulation de plusieurs gènes appartenant aux voies WNT et TGF- β , soit par surexpression soit par inhibition, en utilisant des stratégies de transfert de gène. Pour les approches de transfert de gène, plusieurs candidats ont été sélectionnés parmi les gènes les plus dérégulés : *Cilp* et *Ltbp2* qui appartient à la voie TGF- β , et *Wisp2/CCN5*, *Dkk3* et *Sfrp2* qui appartiennent à la voie WNT.

La protéine CILP-1 est une protéine matri-cellulaire principalement retrouvée dans les chondrocytes du cartilage des articulations, mais son expression a récemment été retrouvée comme significativement plus élevée dans la cardiomyopathie dilatée idiopathique humaine et en cas d'infarctus (van Nieuwenhoven et al., 2017; Yung et al., 2004). Dans le cœur des souris normales, CILP est exprimée par les cardiomyocytes et les fibroblastes, la protéine est retrouvée dans le cytosol, la fraction nucléaire et la matrice extracellulaire (van Nieuwenhoven et al., 2017; Zhang et al., 2018).

Résultats

L'expression de la protéine CILP-1 est augmentée dans un modèle murin de fibrose cardiaque induite et son expression est stimulée par TGF- β 1 (Mori et al., 2006). CILP semble avoir un effet positif sur le remodelage cardiaque, notamment par son effet inhibiteur sur l'activité de TGF- β via la voie de signalisation SMAD en cellule en se liant à TGF- β 1 (Shindo et al., 2017; van Nieuwenhoven et al., 2017; Zhang et al., 2018).

La protéine LTBP-2 (\log_2FC DeltaMex5 = 4,74, \log_2FC DBA/2mdx = 1,94) est une protéine de la famille des *Latent TGF β 1-Binding Protein*, des protéines de la matrice extracellulaire en lien avec la voie TGF- β . LTBP2 régule le relargage de TGF- β 1 et TGF- β 1 promeut l'expression de LTBP-2 (Bai et al., 2012) (Sinha et al., 2002). De plus, LTBP-2 est fortement exprimée et localisée dans les régions fibrotiques du myocarde chez les souris et les patients après un arrêt cardiaque (Gabrielsen et al., 2007) (Park et al., 2018).

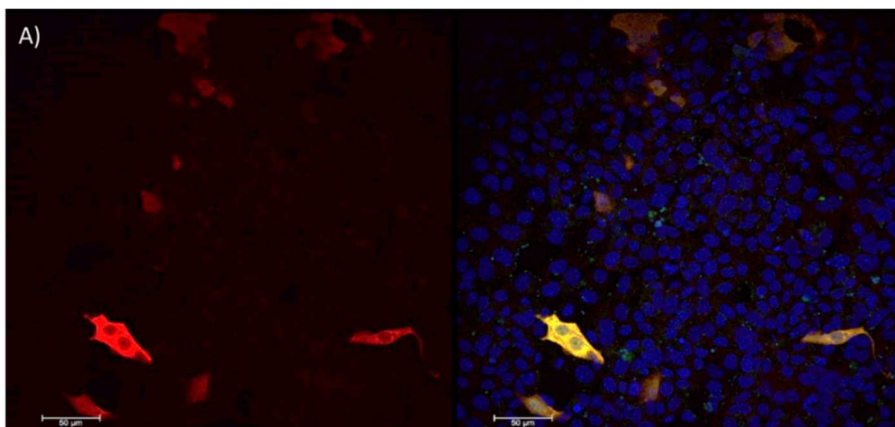
La protéine WISP2/CCN5 ou *WNT1-inducible signaling pathway protein 2* (\log_2FC DeltaMex5 = 1,68, \log_2FC DBA/2mdx = 1,85) est un activateur de la voie canonique WNT. Bien que cette protéine ne soit pas dans le top 30 des gènes, nous l'avons sélectionnée, en raison de son importance dans le contrôle de la voie WNT. Les protéines de la famille CCN sont des protéines de la matrice extracellulaire. La protéine WISP2/CCN5 a l'effet opposé de la *connective tissue growth factor* CTGF/CCN2 : CCN2 agit comme cofacteur de TGF- β dans l'induction de la fibrogenèse, tandis que WISP2/CCN5 inhibe la fibrose cardiaque en inhibant la signalisation TGF- β et la différenciation des fibroblastes (Yoon et al., 2010). WISP2/CCN5 est significativement diminuée chez les patients insuffisants cardiaques sévères, tandis que CCN2 est surexprimée (Jeong et al., 2016). La surexpression de WISP2/CCN5 dans un modèle murin d'insuffisance cardiaque permet la réversion de la fibrose (Jeong et al., 2016).

DKK3 (\log_2FC DeltaMex5 = 3,01, \log_2FC DBA/2mdx = 1,37) est une protéine sécrétée présente dans les cœurs en cours de développement et adultes. Le rôle cardioprotecteur de DKK3 a été démontré dans plusieurs études sur modèles murins de cardiomyopathies ou de fibrose cardiaque par son action sur les voies Wnt (activation de la voie canonique et inhibition des voies non canoniques, inhibition de la voie GSK-3 β / β -caténine) ou l'inhibition de la voie ASK1–JNK/p38 (Lu et al., 2016) (Bao et al., 2015; Zhai et al., 2018). Cependant, il a été constaté que l'expression de DKK3 était régulée à la baisse dans les échantillons myocardiques du ventricule gauche de patients atteints de DCM en insuffisance cardiaque terminale. Ces résultats suggèrent que DKK3 pourrait être régulé à la hausse au stade de la compensation et régulé à la baisse au stade de la décompensation de l'insuffisance cardiaque (Zhang et al., 2014).

Enfin, SFRP2 (\log_2FC DeltaMex5 = 3,62, \log_2FC DBA/2mdx = 1,76) est une protéine sécrétée qui se lie aux ligands Wnt extracellulaires et aux récepteurs frizzled, modulant ainsi la cascade de signalisation. SFRP2 est majoritairement un antagoniste de la voie WNT mais il peut également augmenter sa signalisation, ainsi SFRP2 a un rôle majeur dans la fibrose cardiaque, mais son effet est encore controversé : certaines études le décrivent comme pro-fibrotique ou au contraire anti-fibrotique (He et al., 2010; Kobayashi et al., 2009; Lin et al., 2016; Mastri et al., 2014). Une faible concentration de SFRP2 pourrait augmenter les effets de la voie Wnt et favoriser la fibrose myocardique, tandis qu'une concentration élevée de SFRP2 pourrait antagoniser la voie Wnt et inhiber la fibrose myocardique (Wu et al., 2020). Son action dans les fibroblastes cardiaques semble également impliquée dans la fibrose liée à TGF- β 1 (Ge and Greenspan, 2006).

IV.B.2. Design des vecteurs de transfert de gène

Notre choix pour transférer les différents gènes d'intérêt s'est porté sur des AAV de sérotype 9. En effet il est décrit comme ayant un tropisme cardiaque important (Zincarelli et al., 2008). Pour l'expression des transgènes, le promoteur choisi est le promoteur humain de la troponine cardiaque Tnnt2 (cTnT), un promoteur spécifique des cardiomyocytes (Wei and Jin, 2016). Une première validation du vecteur de surexpression a été réalisée *in vitro* en utilisant une protéine rapportrice de fusion GFP-luciférase couramment utilisée dans notre laboratoire. La GFP est une protéine fluorescente verte issue d'une méduse (*Aequorea victoria*). La luciférase est une enzyme responsable de la bioluminescence chez les lucioles (*Photinus pyralis*) catalysant la réaction de bioluminescence en oxydant la luciférine en oxyluciférine en présence d'oxygène, d'ATP et de Mg²⁺, ce qui provoque l'émission d'un photon qui peut être mesurée *in vivo*. La validation de l'efficacité du vecteur a été réalisée d'une part par transfection de plasmide puis par transduction d'AAV sur des cellules HL1, une lignée de cardiomyocytes murins (Figure 75 A et B). La présence de nombreuses cellules émettant un signal GFP confirme la capacité du promoteur à exprimer et du vecteur AAV9 à pénétrer dans des cellules cardiaques HL-1.



Résultats

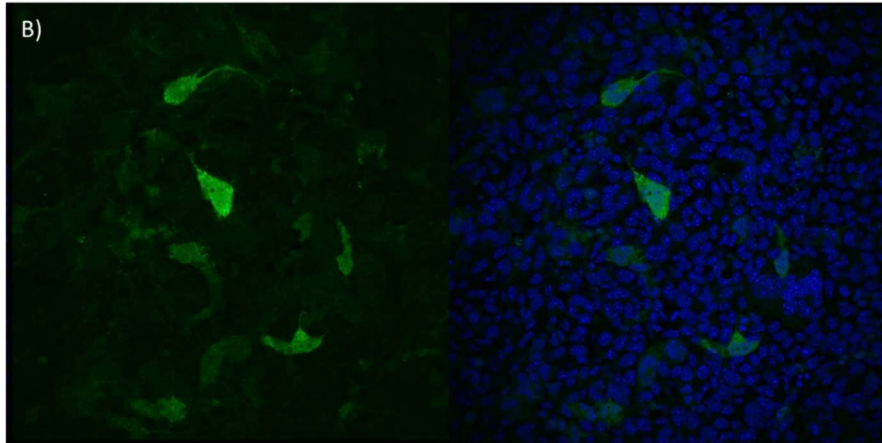


Figure 75 : Test *in vitro* du vecteur hTnt2-GFP-luciférase.

A) Transfection des cellules HL-1 par le plasmide hTnt2-GFP-luciférase. Marquage en rouge de la GFP et en bleu des noyaux. B) Infection des cellules HL-1 par le vecteur AAV9 portant le plasmide hTnt2-GFP-luciférase. Marquage en vert de la GFP et en bleu des noyaux. Echelle, 50 μ m.

Suite à cette évaluation *in vitro* du vecteur, il a été testé *in vivo* dans chez les souris C57BL/6 et des souris DeltaMex5 pour mesurer son efficacité à cibler uniquement le cœur et ce de façon stable même dans un modèle pathologique. Tous les virus recombinants de l'étude ont été produits en suspension par la méthode de tri-transfection. Les souris ont été injectées par le vecteur AAV9-Tnt2-GFP-luciférase à une dose de 2×10^{11} vg par souris à l'âge d'un mois et demi. Les mesures de bioluminescence ont été ensuite prises après injection de luciférine après 15 jours d'expression du vecteur, après 1 mois et demi et enfin après 2 mois et demi d'expression, sur des souris alors âgées de 4 mois. Les images de bioluminescence obtenues montrent la présence d'un signal uniquement dans la région cardiaque (Figure 76A), confirmant la spécificité de l'expression du transgène lorsqu'il est contrôlé par le promoteur hTnt2. Le signal de bioluminescence est constant entre 15 et 75 jours post infection pour les souris C57BL/6, mais également pour les souris DeltaMex5 et aucune différence significative n'est observée entre les deux types de souris (Figure 76B).

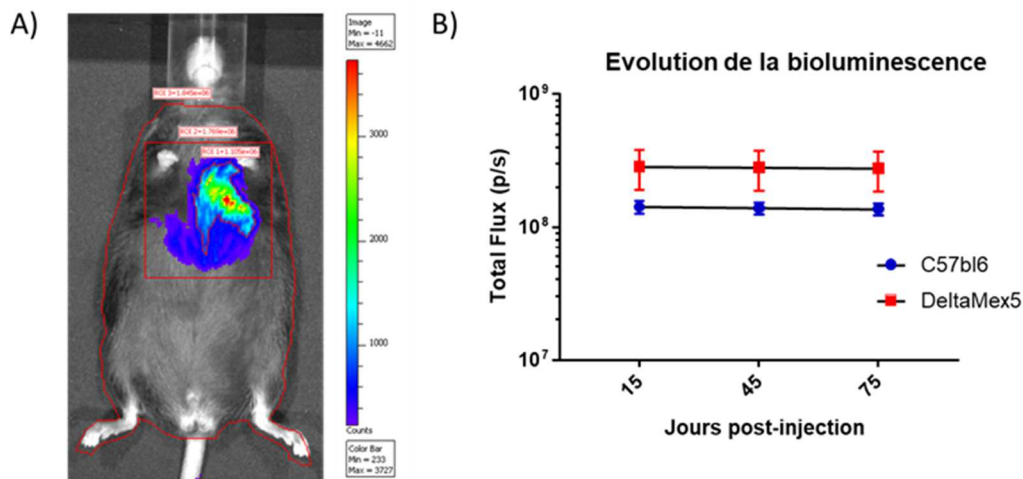


Figure 76 : Analyses de bioluminescence.

A) Imagerie en bioluminescence. B) Evolution de la bioluminescence en fonction du temps chez les souris C57BL/6 et DeltaMex5.

A partir de cette construction GFP-luciférase, nous avons remplacé la région codant pour la GFP et la luciférase par le transgène de notre choix précédé d'un intron chimérique. Les séquences codantes choisies sont les séquences humaines suivantes : CILP (NM003613) pour la voie TGF- β et DKK3 (NM015881), SFRP2 (NM003013) et WISP2 (NM003881) pour la voie WNT.

La stratégie choisie pour l'inhibition des transgènes est celle utilisant les shRNA. Il s'agit de petits ARN ayant une structure en épingle à cheveux, leur action se base sur le principe de l'ARN interférent, en neutralisant l'ARN messenger de la cible. Nous avons choisi des shRNA 4 en 1 pour une efficacité renforcée de la neutralisation du transgène : quatre séquences sh individuelles sont regroupées dans un plasmide. Les shRNA ont été sélectionnés grâce à l'outil RNAi Designer de Thermofisher. Les 4 shRNA avec le meilleur score de recouvrement spécifique au gène d'intérêt ont été choisis. Ils ont ensuite été commandés chez Vigene Bioscience, sous le contrôle de promoteurs ubiquitaires H1 et U6. Des shRNA pour tester l'inhibition de *Cilp*, *Ltbp2* et *Wisp2* ont ainsi été sélectionnés. Les shRNA n'ont pas pu être validés en cellules, car l'expression des 3 protéines endogènes n'est pas détectée dans les cellules musculaires à notre disposition.

IV.B.3. Modulation des gènes de la voie TGF- β (CILP et LTBP2)

La modulation de la voie TGF- β a été testée selon trois modalités : la surexpression de CILP (vecteur AAV9-hTnt2-hCILP) et l'inhibition de CILP (AAV9-4in1shRNA-mCILP-GFP) et de LTBP2. La raison pour laquelle la surexpression de LTBP2 n'a pas été testé est lié à la taille de son ADNc. Les souris âgées de 1 mois ont été injectés en intraveineuse à une dose de 2^{e11} vg/souris (ce qui équivaut à une dose de 1^{e13} vg/kg pour une souris d'environ 20 g) ou par du PBS. Après 3 mois d'expression du vecteur, les cœurs des souris ont été échographiés avant leur prélèvement. Les conséquences sur le cœur au niveau global, histologique et fonctionnel ont ensuite été étudiées.

IV.B.3.a. Validation in vitro du plasmide hTnt2-hCILP

La capacité du vecteur à exprimer CILP a été testée sur les cellules HL-1. Les cellules HL-1 transfectées par le plasmide hTnt2-hCILP et marquées à l'aide d'un anticorps anti-CILP présentent un signal plus ou moins fort en fonction des cellules, mais bien différencié du bruit de fond observé dans les cellules non transfectées (Figure 77). Cette expérience a de plus permis de valider l'efficacité de l'anticorps à détecter la protéine en immunofluorescence.

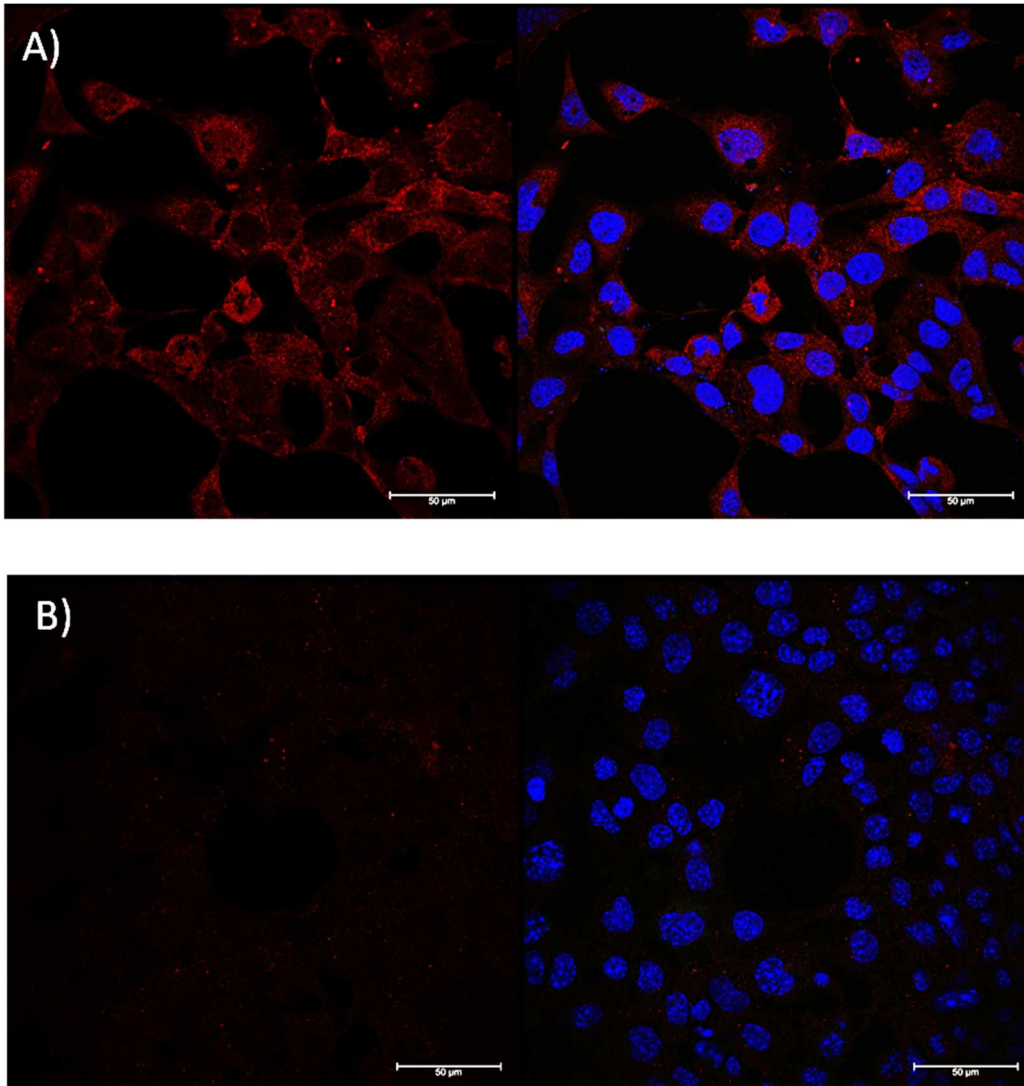


Figure 77 : Transfection des cellules HL-1 par le plasmide hTnt2-hCILP. Marquage en rouge de CILP et en bleu des noyaux. A) Cellules transfectées par le plasmide hTnt2-CILP. B) Cellules non transfectées. Echelle, 50 μm.

IV.B.3.b.Expression des transgènes après transfert de gène

L'expression du vecteur dans le cœur a été vérifiée chez les souris injectées par l'AAV9-hTnt2-hCILP par dosage de l'abondance relative de hCILP en RT-qPCR. Le transgène étant un transgène humain, il n'est détecté que chez les souris injectées par le vecteur mais pas chez les souris injectées en PBS (Figure 78A). L'expression des vecteurs AAV9-4in1shRNA-mCILP-GFP et AAV9-4in1shRNA-mLTBP2-GFP est détectée grâce au gène rapporteur GFP qui n'est présent que chez les souris injectées par les vecteurs (Figure 78B). Ces analyses RT-qPCR confirment la présence des transgènes 3 mois après l'injection des vecteurs.

Une RT-qPCR a été réalisée sur le gène *Cilp* murin afin d'évaluer l'efficacité du vecteur AAV9-4in1shRNA-mCILP-GFP (Figure 78C). Le taux de *mCilp* n'est pas diminué dans le cœur des souris

Résultats

injectées par le vecteur AAV9-4in1shRNA-mCILP-GFP par rapport aux souris DeltaMex5 injectées en PBS et les valeurs sont très variables entre les différentes souris (ratio DeltaMex5-shCILP par rapport à C57BL/6 = $39,22 \pm 10,89$ versus ratio DeltaMex5-PBS = $16,03 \pm 2,33$, $n=4$, $P > 0,05$). Il est possible que le shRNA ait eu une action seulement au niveau de la protéine. Il serait donc nécessaire de réaliser un western blot, expérience qui n'a pas été encore réalisée à ce jour. Néanmoins, et dans l'attente de ces résultats, j'ai conservé dans la thèse la présentation des résultats obtenus avec ce vecteur. Une RT-qPCR a également été réalisée sur le gène *Ltbp2* murin afin d'évaluer l'efficacité du vecteur AAV9-4in1shRNA-mLTBP2-GFP (Figure 78D). Les souris DeltaMex5 injectées par le vecteur AAV9-4in1shRNA-mLTBP2-GFP ont un taux de *Ltbp2* significativement diminué par rapport aux souris DeltaMex5 injectées en PBS (ratio DeltaMex5-shLTBP2 par rapport à C57BL/6 = $74,01 \pm 10,39$ versus ratio DeltaMex5-PBS = $26,78 \pm 13,22$, $n=4$, $P=0,03$).

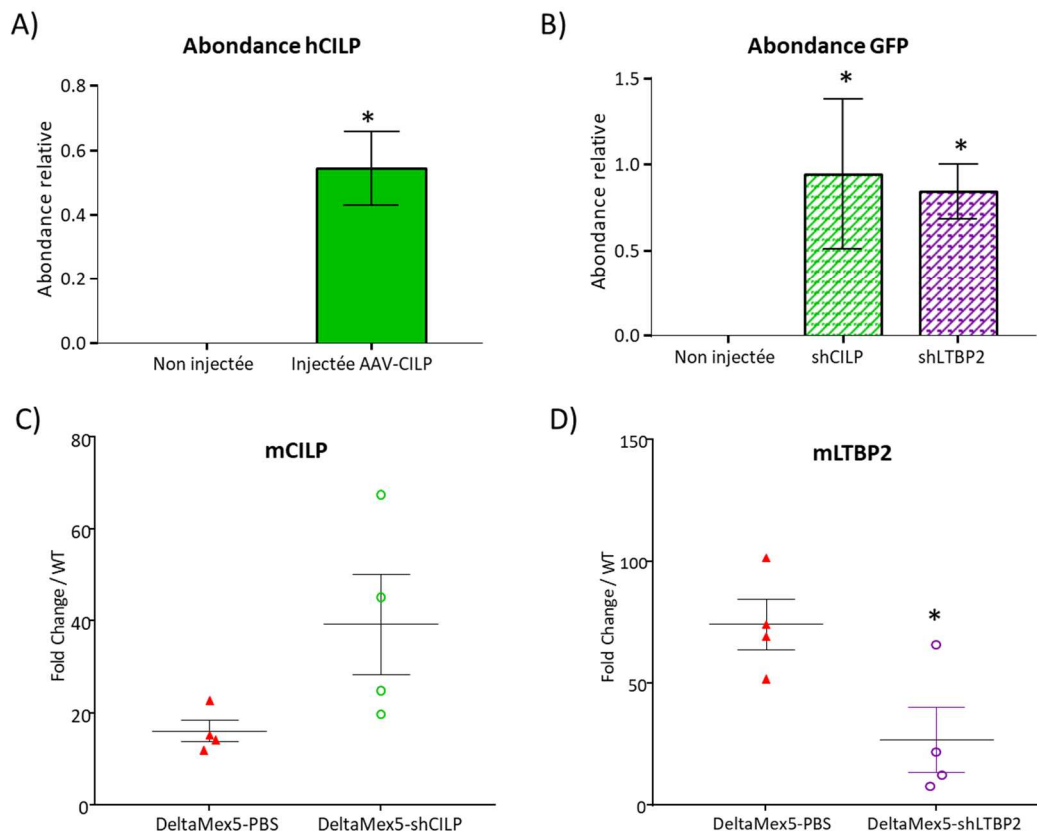


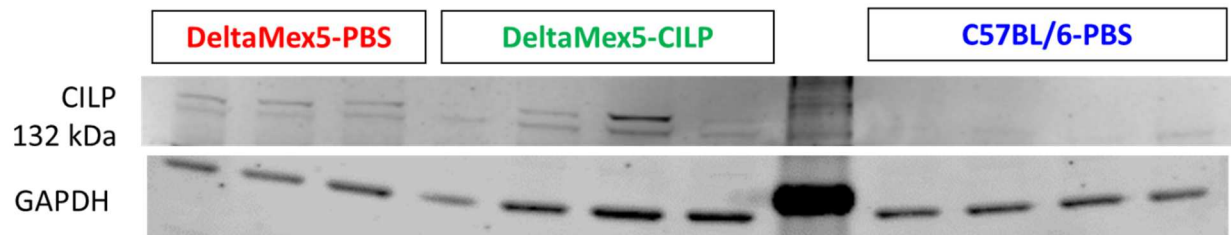
Figure 78 : Expression des transgènes et des gènes endogènes CILP et LTBP2.

A) Abondance relative en RT-qPCR du transgène hCILP chez les souris DeltaMex5 injectées ou non injectées par le vecteur AAV9-hTntt2-hCILP. B) Abondance relative en RT-qPCR du transgène GFP chez les souris DeltaMex5 injectées ou non injectées par les vecteurs AAV9-4in1shRNA-mCILP-GFP et AAV9-4in1shRNA-mLTBP2-GFP. C) Mesure RT-qPCR du gène *Cilp* murin. Mesures exprimées en ratio par rapport aux souris C57BL/6. D) Mesure RT-qPCR du gène *Ltbp2* murin. Mesures exprimées en ratio par rapport aux souris C57BL/6. Test de Student et GFP. $n=4$. Test de Mann-Whitney.

La présence de la protéine CILP a été recherchée dans les extraits protéiques de cœur par western blot avec un anticorps dirigé contre CILP (Figure 79). La glycéraldéhyde-3-phosphate

Résultats

déshydrogénase (GAPDH) est utilisée comme normalisateur car elle est invariante dans les différents modèles. La surexpression protéique de CILP entre les souris DeltaMex5 et C57BL/6 est visible par une absence de marquage de CILP chez les souris contrôle alors que la présence de GAPDH est constante (ratio CILP/GAPDH DeltaMex5-PBS = $40,88 \pm 5,56$ versus ratio C57BL/6-PBS = $6,80 \pm 4,73$, $P = 0,005$). En revanche, il n'est pas observé de surexpression de la protéine dans le cœur des souris DeltaMex5 injectées par le vecteur AAV9-hTnt2-hCILP (ratio DeltaMex5-PBS = $31,64 \pm 13,53$, $P > 0,05$).



	DeltaMex5-PBS	DeltaMex5-hCILP	C57BL/6-PBS
Ratio CILP/GAPDH	40,88	31,64	6,80
SEM	5,57	13,53	4,73
pValue / DeltaMex5-PBS	/	0,603	0,005

Figure 79 : Western blot dirigé contre la protéine CILP .

Souris DeltaMex5 injectées en PBS, souris DeltaMex5 injectées par le vecteur AAV9-hTnt2-hCILP et souris C57BL/6 injectées en PBS.

Afin de comprendre l'absence de surexpression visible du transgène au niveau protéique, plusieurs analyses ont été effectuées. Tout d'abord, un western blot a été réalisé sur des extraits protéiques après séparation en quatre fractions : le cytosol, les membranes, le cytosquelette et le noyau. La répartition de la protéine CILP entre les souris DeltaMex5 injectées par le PBS et les souris DeltaMex5 injectées par l'AAV9-hTnt2-hCILP semble la même pour tous les compartiments cellulaires (Figure 80A). La normalisation des résultats entre les différents compartiments est compliquée par la nécessité de trouver une protéine spécifique de chaque compartiment qui ne soit pas modifiée dans le modèle. Nous avons également réalisé une quantification de la protéine par un test immunologique ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) dans les extraits protéiques de cœurs sans observer de différences (DeltaMex5-AAV9-hTnt2-hCILP : 111 ± 43 ng/mL versus DeltaMex5-PBS : 81 ± 17 ng/mL, $P > 0,05$, $n=4$). Un marquage immuno-histologique a été effectué sur des coupes de tissus cardiaques avec des anticorps dirigés contre CILP, sans que soit observée une différence de localisation ou une différence d'intensité du signal (Figure 80B). Enfin, une RT-qPCR a été réalisée sur le gène *Cilp* murin. Les résultats indiquent que les souris DeltaMex5 injectées par le vecteur AAV9-hTnt2-hCILP ont un taux de *Cilp* significativement diminué par rapport aux souris DeltaMex5 injectées en PBS (ratio DeltaMex5-CILP par rapport à C57BL/6 = $8,12 \pm 1,64$ versus ratio DeltaMex5-PBS = $16,03 \pm 2,33$, $n=4$, $P=0,03$) (Figure 80C).

Résultats

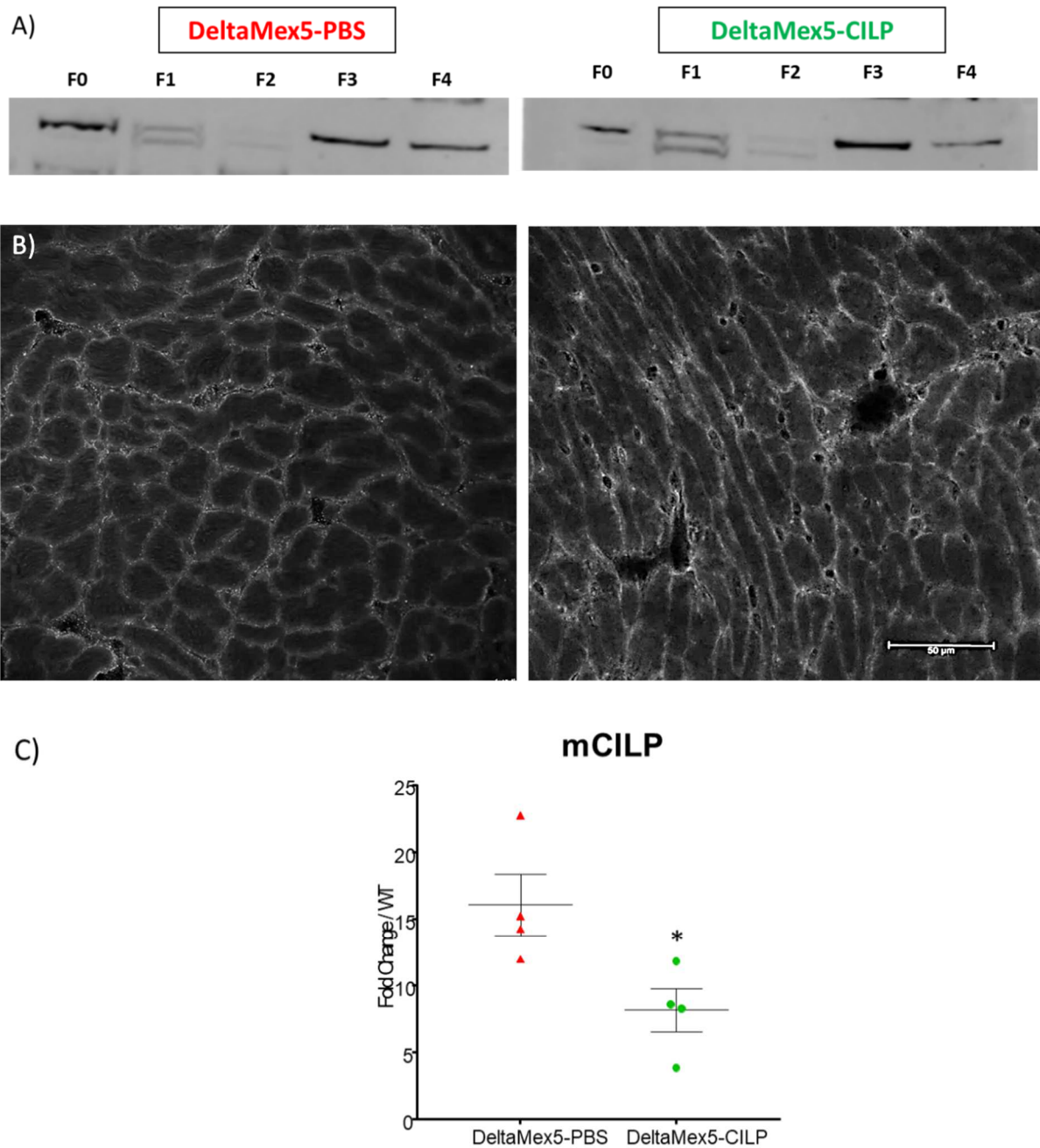


Figure 80 : Analyse de l'expression de CILP.

A) Western blot dirigé contre la protéine CILP chez les souris DeltaMex5 injectées en PBS et les souris DeltaMex5 injectées par le vecteur AAV9-hTnt2-hCILP dans les différents compartiments cellulaires. F0 : fraction totale. F1 : fraction cytosolique. F2 : fraction membranaire. F3 : fraction nucléaire. F4 : fraction cytosquelettique. B) Marquage immuno-histo fluorescent de CILP. Souris DeltaMex5 injectées en PBS à gauche. Souris DeltaMex5 injectées par AAV9-hTnt2-hCILP à droite. Echelle, 50 µm. C) Mesure RT-qPCR du gène *Cilp* murin. Mesures exprimées en ratio par rapport aux souris C57BL/6. n=4. Test de Mann-Whitney.

Les analyses n'ont pas permis de confirmer de façon claire la surexpression de CILP au niveau protéique bien que nous ayons une confirmation de l'efficacité du transfert de gène par la présence du transgène au niveau de l'ARN. Cependant, nous avons montré que le gène *Cilp* murin voit son expression diminuer. Etant donné qu'il n'existe pas d'anticorps permettant de différencier la protéine

humaine de la protéine murine, il est donc possible que l'absence d'observation de surexpression au niveau protéique soit due à une diminution concomitante de la protéine endogène. Ceci laisse penser qu'il existe une boucle de rétrocontrôle de la protéine sur son expression transcriptionnelle.

IV.B.3.c. Evaluation morphologique

La masse des souris est significativement diminuée chez les souris traitées par le vecteur AAV9-hTnnt2-hCILP après 3 mois ($29,38 \pm 1,29$ g, $n=4$, versus $34,9 \pm 1,3$ g, $n=8$, $P=0,024$) et par le vecteur AAV9-4in1shRNA-mCILP-GFP ($29,5 \pm 1,31$ g, $n=4$, $P=0,027$). La masse des souris traitées par le vecteur AAV9-4in1shRNA-mLTBP2-GFP reste similaire ($32,13 \pm 1,76$, $P>0,05$). Les valeurs ne sont plus significativement différentes de la masse moyenne des souris C57BL/6 ($28,81 \pm 0,72$, $n=11$) (Figure 81A). L'hypertrophie du cœur, mesurée par le ratio de la masse du cœur sur la masse totale de la souris, chez les souris traitées par le vecteur AAV9-hTnnt2-hCILP reste proche des souris DeltaMex5 ($0,68 \pm 0,04$, $n=4$ versus $0,63 \pm 0,02$ %, $n=8$, $P>0,05$), mais devient significativement augmentée en comparaison des souris C57BL/6 ($0,57 \pm 0,02$ %, $n=7$, $P=0,027$). En revanche, elle est significativement diminuée chez les souris traitées par le vecteur AAV9-4in1shRNA-mCILP-GFP en comparaison des souris DeltaMex5 non traitées ($0,51 \pm 0,05$, $n=4$, $P=0,022$) et chez les souris traitées par le vecteur AAV9-4in1shRNA-mLTBP2-GFP ($0,53 \pm 0,048$) elle devient comparable aux souris C57BL/6 (Figure 81B).

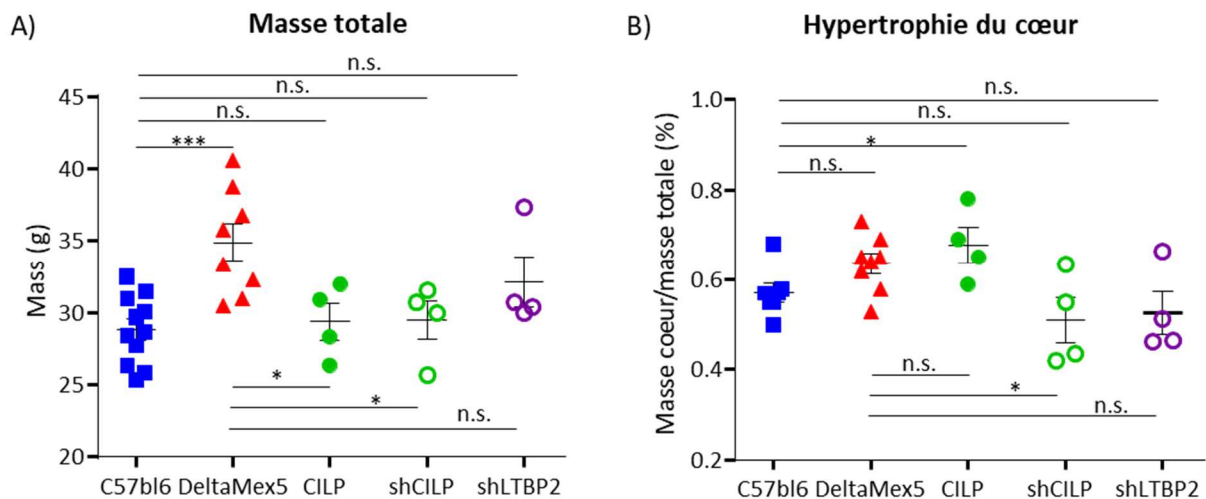


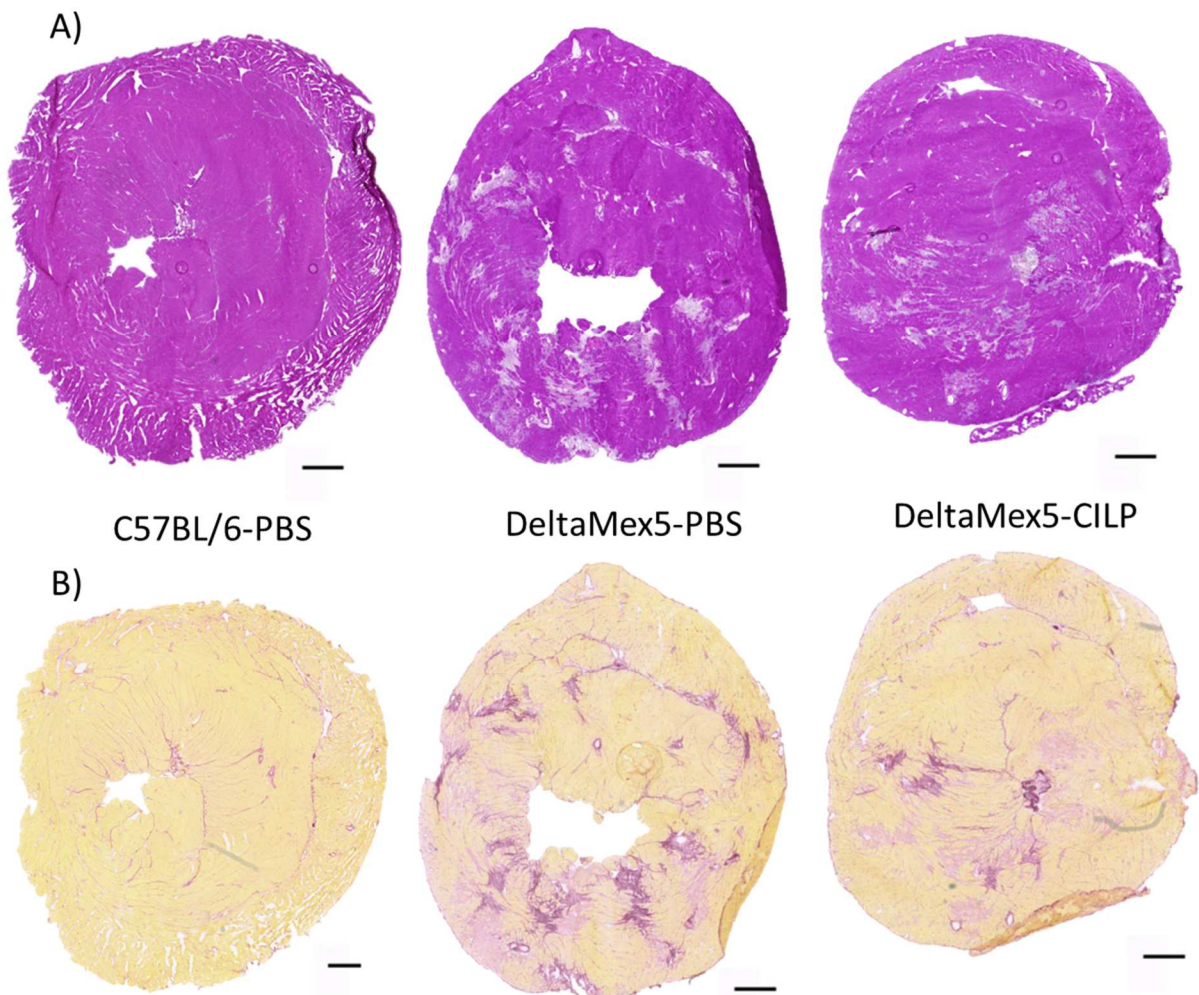
Figure 81 : Analyse morphologique.

A) Masse totale des souris. B) Mesure de l'hypertrophie cardiaque : masse du cœur/masse totale de la souris (%). Test de Mann-Whitney.

Des analyses histologiques ont ensuite été effectuées sur le cœur des souris. La coloration HPS révèle une persistance du tissu lésé, chez les souris traitées par les différents vecteurs (Figure 82A). La coloration au Rouge Sirius démontre encore la présence de tissus fibrotique dans le cœur des souris traitées avec les trois vecteurs, mais en quantité moins importante en comparaison des souris

Résultats

DeltaMex5 contrôle (Figure 82B). La quantification de la fibrose par WEKA dans les tissus par la coloration du collagène au rouge Sirius confirme que le taux de fibrose global est diminué dans le cœur des souris DeltaMex5 traitées par AAV9-hTnt2-hCILP en comparaison du cœur des souris DeltaMex5-PBS ($17,59 \pm 1,27$ % versus $33,31 \pm 4,65$ %, $P=0,028$, $n=4$), bien qu'il reste toujours supérieur au taux de fibrose du cœur des souris C57BL/6 ($7,11 \pm 0,77$ %, $P=0,0004$, $n = 4$). En regardant les différents types de fibrose, il est observé que la fibrose installée varie peu ($4,14 \pm 0,45$ % versus $4,95 \pm 1,95$ %), mais la fibrose récente est significativement moins présente chez les souris DeltaMex5 ayant reçu l'AAV9-hTnt2-hCILP ($12,64 \pm 2,04$ % versus $29,17 \pm 4,24$, $P= 0,0126$) (Figure 82C). Les quantifications sur les échantillons traités par les AAV portant les shRNA n'ont pas encore été réalisées mais l'observation des coupes indique que la fibrose est diminuée.



Résultats

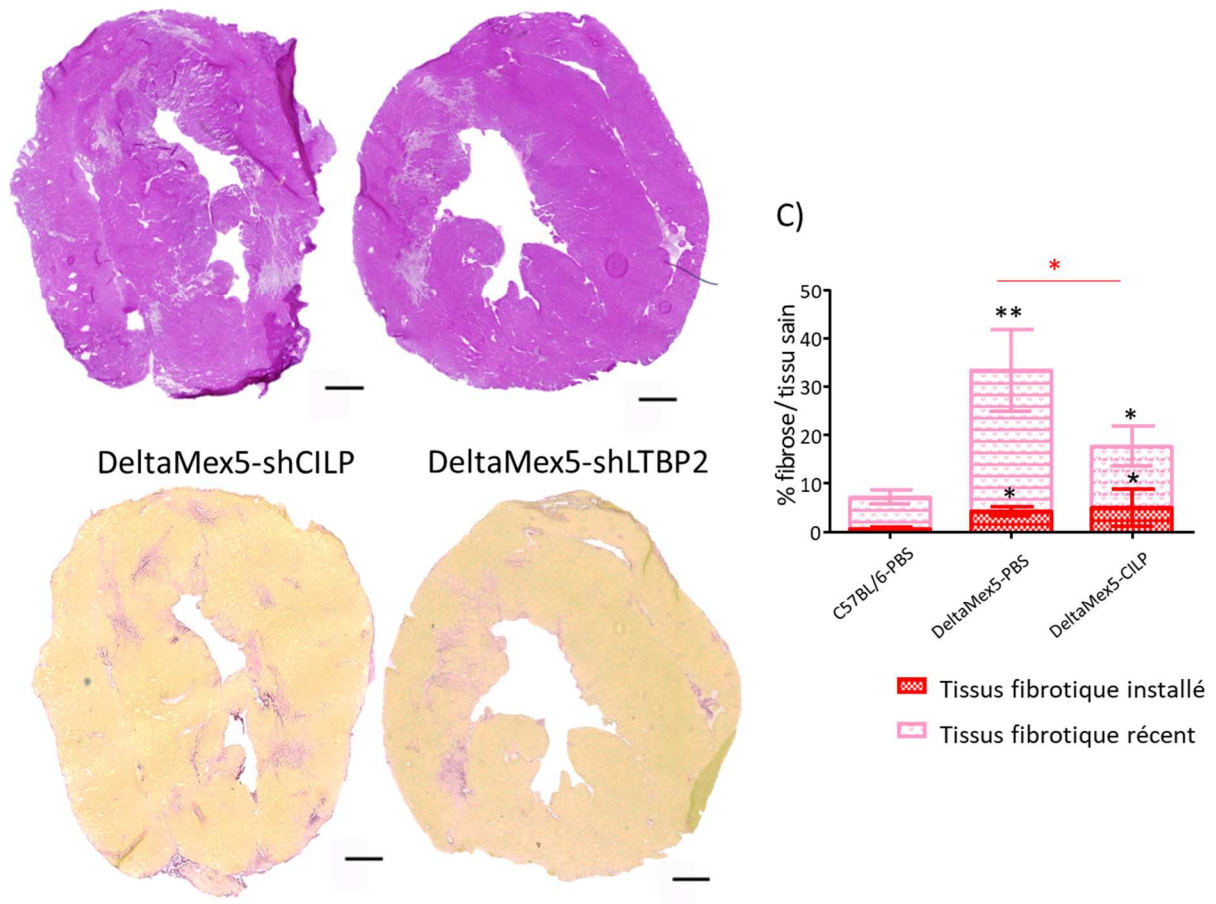


Figure 82 : Caractérisation histologique du cœur après traitement par AAV9-hTnnt2-hCILP, AAV9-shCILP ou AAV-shLTBP2 des souris DeltaMex5 et des contrôles injectées en PBS.

A) Coloration en HPS du cœur. B) Coloration en rouge Sirius du cœur. Echelle, 500 μ m. C) Quantification de la proportion des types de fibres comparées aux tissus sains. Test de Mann-Whitney.

IV.B.3.d. Evaluation fonctionnelle

Des analyses par échographie de la fonction cardiaque ont été effectuées à 4 mois, après 3 mois d'expression des vecteurs (Figure 83). Parmi les paramètres évalués (estimation de la masse et volume du ventricule gauche, fraction d'éjection), il est retrouvé une variation significative pour l'estimation de la masse du ventricule gauche chez les souris injectées par l'AAV9-4in1shRNA-mCILP-GFP avec une baisse de près de 40 % en comparaison des contrôles DeltaMex5 ($127 \pm 11,05$ mg, $n=4$, versus $190 \pm 12,77$ mg, $n=8$, $P= 0,004$). Il en est de même pour les souris injectées par AAV9-4in1shRNA-mLTBP2-GFP ($133 \pm 4,74$ mg, $n=4$, $P= 0,004$).

Résultats

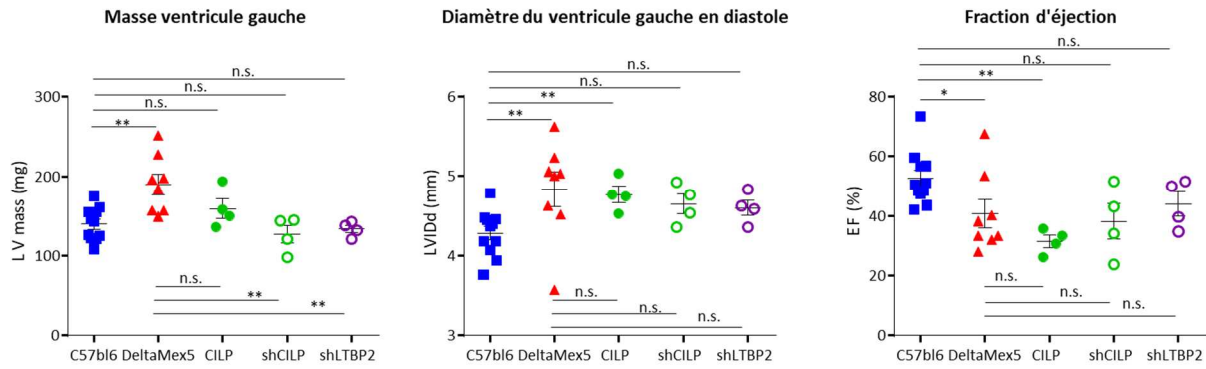
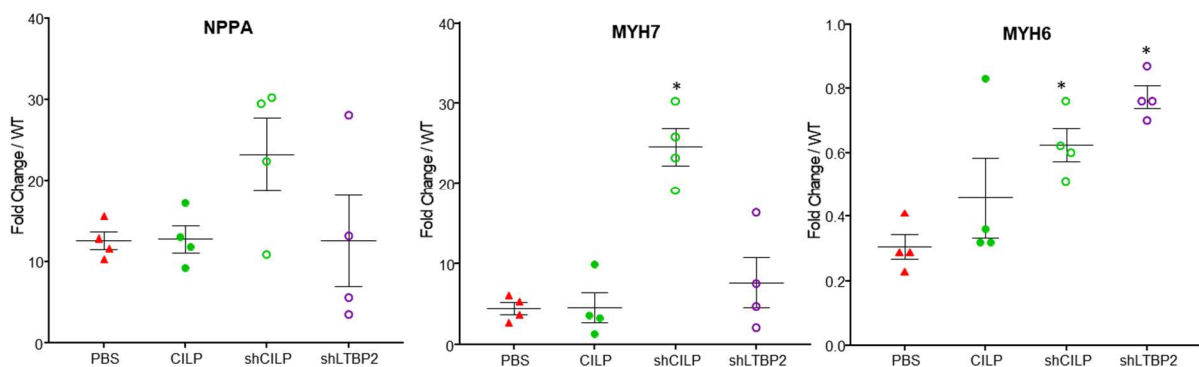


Figure 83 : Comparaison des marqueurs de la DCM mesurés en échographie entre les souris C57BL/6, les souris DeltaMex5 et les souris DeltaMex5 injectées par les vecteurs CILP, shCILP et shLTBP2. Test de Mann-Whitney.

IV.B.3.e. Evaluation moléculaire

Des marqueurs tissulaires ARN de l'atteinte cardiaque (*Nppa*, *Myh7*, *Myh6*, *Timp1*, *Tgf-β1*) ont été mesurés par RT-qPCR (Figure 84). Chez les souris injectées par le vecteur AAV9-4in1shRNA-mCILP-GFP, *Myh7* est significativement augmenté par rapport aux souris PBS ($24,59 \pm 2,35$, $P = 0,028$), *Myh6* est également augmenté ($0,62 \pm 0,05$, $P = 0,028$). La β -caténine qui était inchangée entre les souris DeltaMex5 et les souris C57BL/6 est légèrement augmentée ($1,21 \pm 0,06$, $P = 0,028$). Seul *Timp1* est significativement diminué chez les souris injectées par rapport au souris DeltaMex5-PBS ($31,67 \pm 6,98$, $P = 0,028$). Chez les souris injectées par le vecteur AAV9-4in1shRNA-mLTBP2-GFP, *Myh6* et la β -caténine sont augmentées par rapport au cœur des souris non injectées ($0,77 \pm 0,035$, $P = 0,028$ et $0,99 \pm 0,008$, $P = 0,028$) et sont normalisés par rapport aux souris C57BL/6 avec un ratio proche de 1. A l'inverse, *TIMP1* et *TGF-β* sont diminués ($12,31 \pm 3,49$, $P = 0,028$ et $1,24 \pm 0,11$, $P = 0,028$), et *TGF-β* est normalisé par rapport aux souris C57BL/6.



Résultats

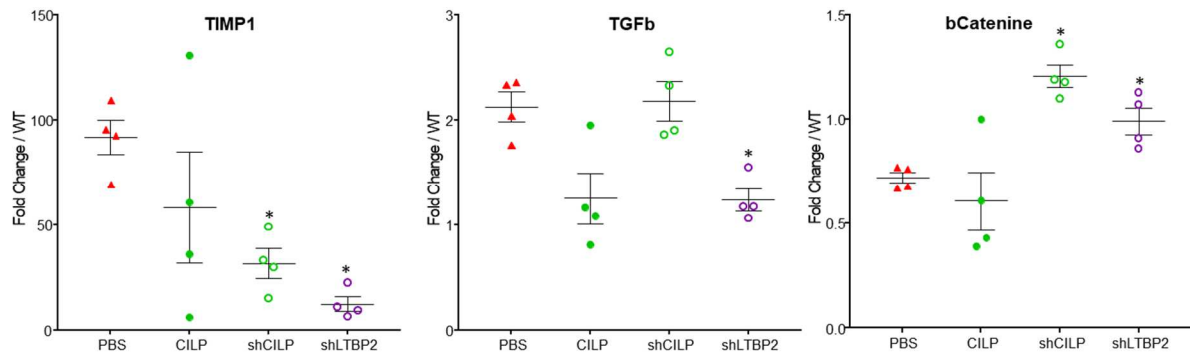
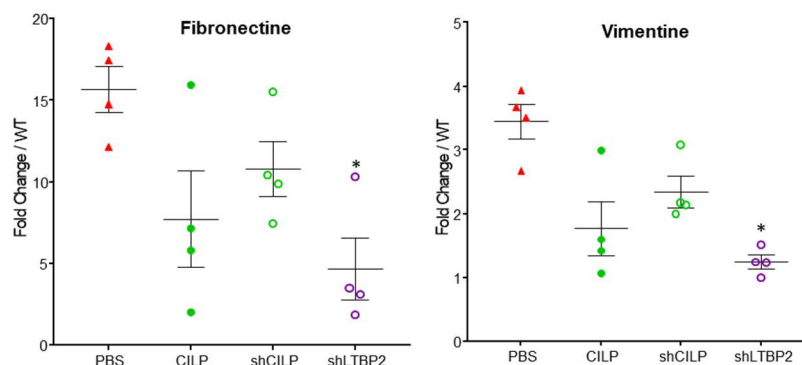


Figure 84 : Mesure RT-qPCR de différents marqueurs ARN de l'atteinte cardiaque. Mesures exprimées en ratio par rapport aux souris C57BL/6. Test de Mann-Whitney.

Des marqueurs tissulaires ARN de la fibrose (Fibronectine, Vimentine, Collagène 1a1 et Collagène 3a1) ont également été mesurés par RT-qPCR. Chez les souris injectées par l'AAV9-hTnt2-hCILP, les 3 marqueurs principaux de la fibrose sont diminués par rapport aux souris injectées par du PBS : fibronectine ($7,72 \pm 2,95$ versus $15,67 \pm 1,4$, $P < 0,05$), vimentine ($1,77 \pm 0,43$ versus $3,45 \pm 0,27$, $P > 0,05$) et collagène 1a1 ($3,95 \pm 1,13$ versus $6,92 \pm 0,41$, $P > 0,05$). Le collagène 3a1 a une tendance non significative à la diminution ($5,72 \pm 1,68$ versus $9,35 \pm 0,49$, $P=0,08$). Ces résultats sont en lien avec les résultats précédents : il n'y a pas d'amélioration de la fonction cardiaque chez les souris traitées, mais il y a une amélioration de la fibrose. De façon intéressante, pour tous les marqueurs, la souris montrant la meilleure normalisation des résultats par rapport aux souris C57BL/6 est la souris présentant le taux de hCILP le plus élevé. Chez les souris injectées par le vecteur AAV9-4in1shRNA-mCILP-GFP, seule la fibronectine et la vimentine ont une tendance à la diminution. Tandis que chez les souris injectées par AAV9-4in1shRNA-mLTBP2-GFP la fibronectine et la vimentine sont significativement diminuées ($4,68 \pm 1,91$, $P = 0,028$ et $1,25 \pm 0,10$, $P = 0,028$). La vimentine est normalisée par rapport aux souris C57BL/6.



Résultats

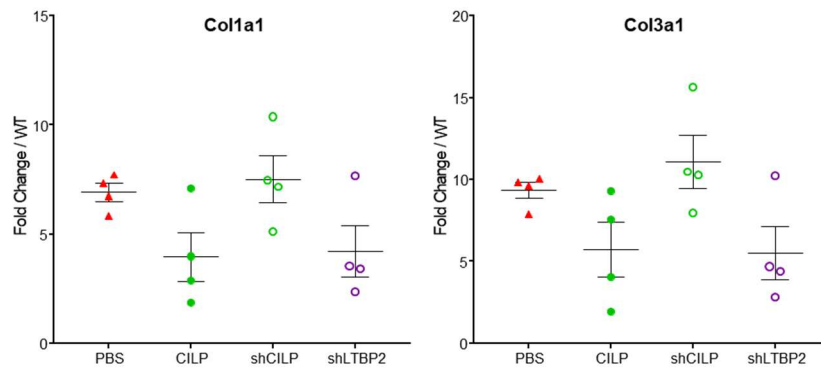


Figure 85 : Mesure RT-qPCR de différents marqueurs ARN de la fibrose cardiaque. Mesures exprimées en ratio par rapport aux souris C57BL/6. Test de Mann-Whitney.

Afin de déterminer l'impact du vecteur AAV9-hTnt2-hCILP sur les voies TGF- β et WNT, nous avons utilisé les kits de screening des gènes cibles de ces deux voies sur les échantillons des souris traitées. Sur les 30 gènes cibles de la voie WNT surexprimés dans le cœur du modèle DeltaMex5 comparés au cœur des contrôles C57BL/6, 13 gènes voient leur expression diminuer dans le cœur des souris traitées et 5 gènes sont plus exprimés après traitement (Figure 86A). Sur les 25 gènes cibles de la voie TGF- β surexprimés dans le cœur du modèle DeltaMex5 comparés au cœur des contrôles C57BL/6, 13 gènes voient leur expression diminuer dans le cœur des souris traitées et 3 gènes sont plus exprimés après traitement (Figure 86B). De nouveau, pour tous les marqueurs, la souris montrant la meilleure normalisation des résultats par rapport aux souris C57BL/6 est la souris présentant le taux de hCILP le plus élevé.

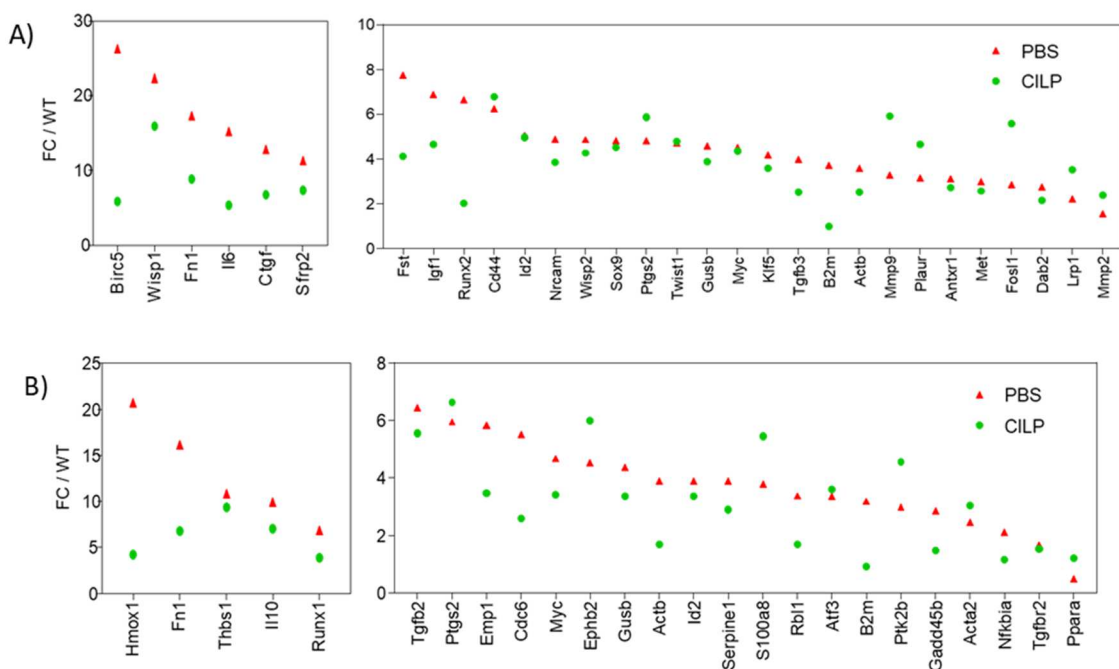


Figure 86 : Analyse RT2 profiler PCR array sur les souris traitées par hCILP.

A) Comparaison de l'expression ARN des différentes cibles de la voie WNT. B) Comparaison de l'expression ARN des différentes cibles de la voie TGF- β entre les souris DeltaMex5-PBS et les souris DeltaMex5-AAV9-hTnt2-CILP en ratio par rapport aux niveaux d'expression chez les souris C57BL/6-PBS.

IV.B.4. Modulation de la voie WNT (*WISP2*, *DKK3* et *SFRP2*)

IV.B.4.a. Expression des transgènes après transfert de gène

La modulation de la voie WNT a été testée selon quatre modalités : la surexpression de *WISP2*, *DKK3* et *SFRP2* et l'inhibition de *WISP2*. Les souris âgées de 1 mois ont été injectées en intraveineuse à une dose de 2×10^{11} vg/souris ou par du PBS. Après 3 mois d'expression du vecteur, les cœurs des souris ont été échographiés avant leur prélèvement.

L'expression des vecteurs dans le cœur a été vérifiée chez les souris injectées par l'AAV9-hTnt2-h*WISP2*, l'AAV9-hTnt2-h*DKK3* et l'AAV9-hTnt2-h*SFRP2* par dosage en RT-qPCR de l'abondance relative de h*WISP2*, h*DKK3* et h*SFRP2* respectivement (Figure 87A). Chaque transgène est détecté chez les souris injectées par le vecteur correspondant. L'expression du vecteur AAV9-4in1shRNA-m*WISP2*-GFP est détectée grâce au gène rapporteur GFP qui n'est présent que chez les souris injectées par le vecteur (Figure 87B). Une RT-qPCR a été réalisée sur le gène *Wisp2* murin afin d'évaluer l'efficacité du vecteur AAV9-4in1shRNA-m*WISP2*-GFP. Aucune différence significative n'est observée entre les trois groupes de souris, ce qui met en doute l'efficacité du vecteur AAV9-4in1shRNA-m*WISP2*-GFP (Figure 87). Pour cette raison, seules les données relatives à la surexpression seront présentées ci-après.

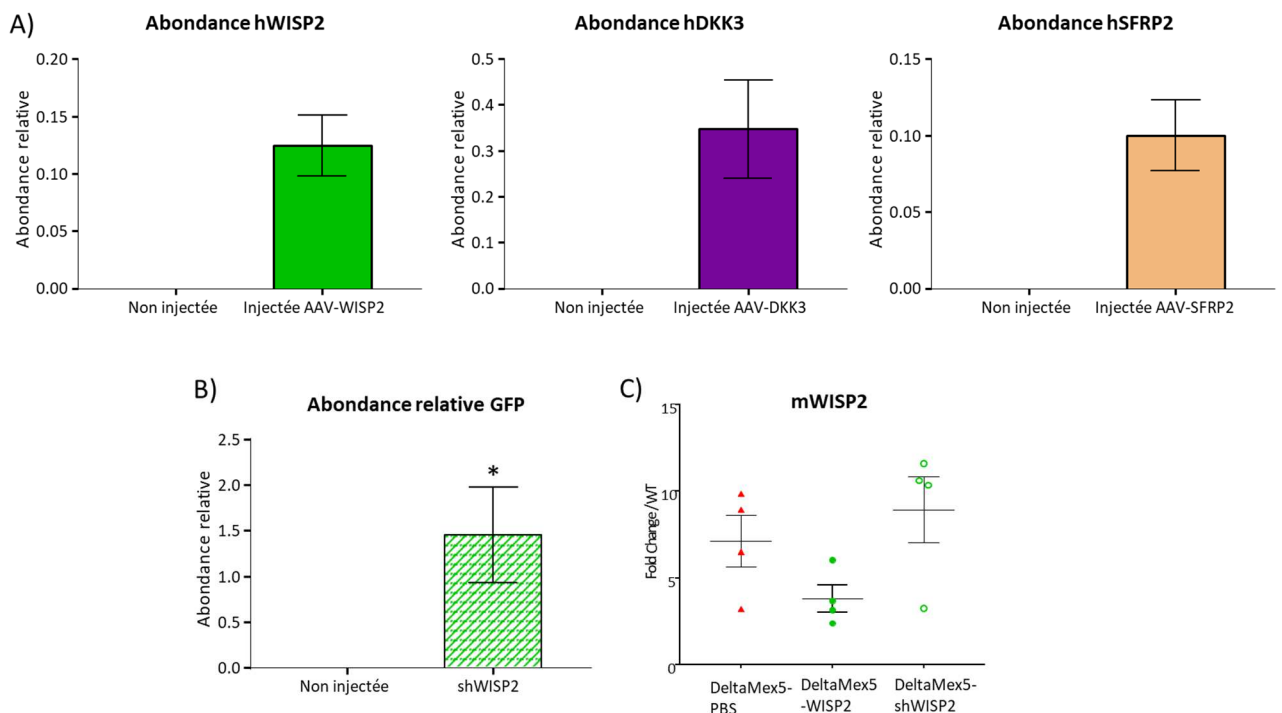


Figure 87 : Expression des transgènes et des gènes endogènes WISP2, DKK3 et SFRP2.

A) Abondance relative en RT-qPCR des transgènes hWISP2, hDKK3, hSFRP2 chez les souris DeltaMex5 injectées ou non injectées par les vecteurs AAV9-hTnt2-hWISP2, AAV9-hTnt2-hDKK3 et AAV9-hTnt2-hSFRP2 respectivement. B) Abondance relative en RT-qPCR du transgène GFP chez les souris DeltaMex5 injectées ou non injectées par le vecteur AAV9-4in1shRNA-mWISP2-GFP. C) Mesure RT-qPCR du gène *Wisp2* murin. Mesures exprimées en ratio par rapport aux souris C57BL/6. n=4. Test de Mann-Whitney.

IV.B.4.b. Evaluation morphologique

La masse des souris traitées par les trois vecteurs reste similaire à celle des souris DeltaMex5 non traitées (WISP2 : 35,7 ± 1,106 ; DKK3 : 32,58 ± 1,31 g ; SFRP2 : 32,8 ± 1,45 g) (

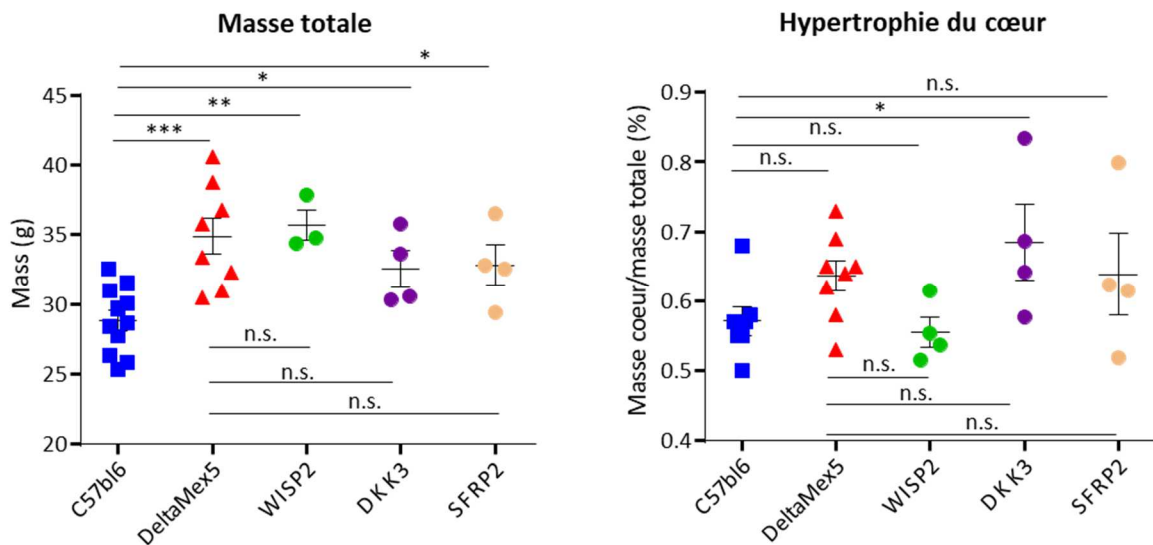


Figure 88), de même que l'hypertrophie du cœur mesurée par la masse du cœur proportionnellement à la masse totale de la souris (WISP2 : 0,55 ± 0,02 % ; DKK3 : 0,68 ± 0,05 % ; SFRP2 : 0,64 ± 0,06 %).

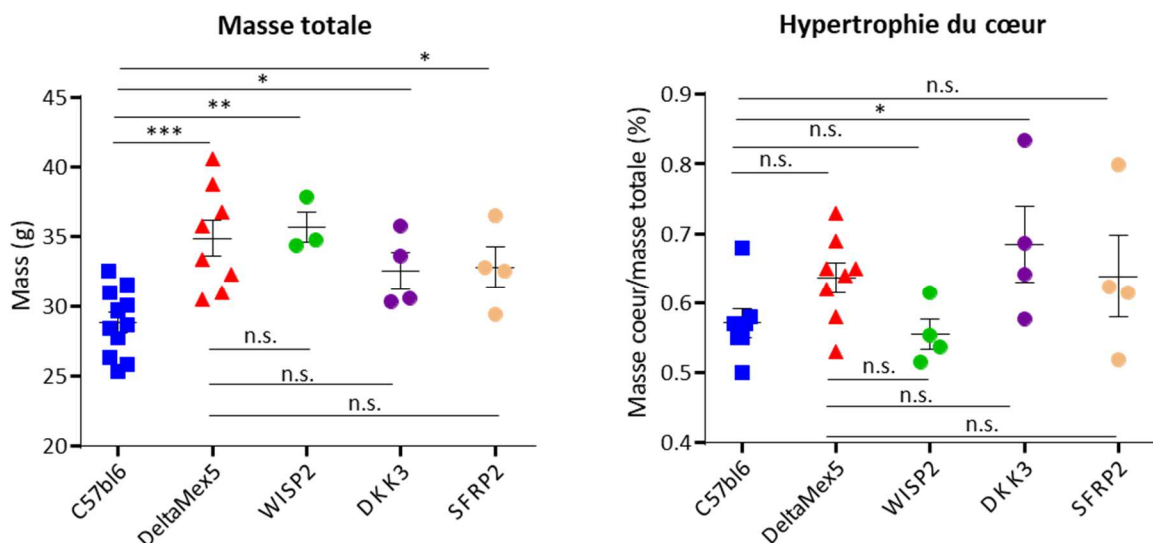
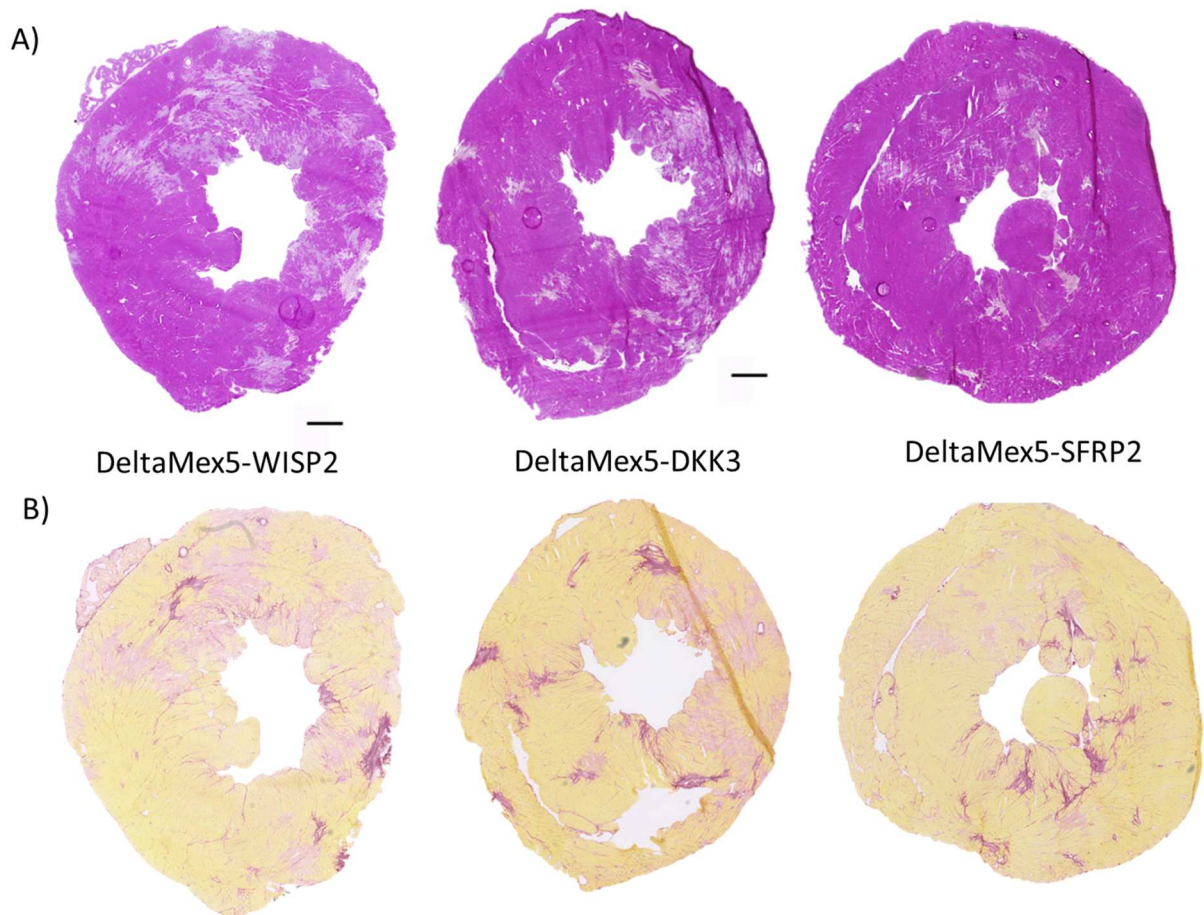


Figure 88 : Masse totale des souris et mesure de l'hypertrophie cardiaque.

Test de Mann-Whitney.

A l'histologie, la coloration HPS révèle une persistance du tissu lésé, chez les souris traitées par les trois vecteurs (Figure 89A). La coloration au rouge Sirius démontre encore la présence de tissus fibrotiques dans le cœur des souris traitées mais semble plus faible pour les vecteurs AAV9-hTnt2-DKK3 et SFRP2 (Figure 89B). La quantification de la fibrose par WEKA dans les tissus par la coloration du collagène au rouge Sirius confirme que le taux de fibrose globale ($24,73 \pm 4,70$ % versus $33,31 \pm 4,65$ %, $P > 0,05$, $n=4$), ainsi que les taux des différents types de fibrose ne sont pas changés par le traitement des souris AAV9-hTnt2-hWISP2. Pour les vecteurs AAV9-hTnt2-hDKK3 et SFRP2, les taux de fibrose globale sont diminués (DKK3 : $17,31 \pm 4,79$ % ; SFRP2 : $18,38 \pm 3,69$ % versus $33,31 \pm 4,65$ %, $P=0,028$ et $P > 0,05$ $n=4$), et cela est dû à une diminution de la fibrose récente uniquement (DKK3 : $11,5 \pm 1,01$ % ; SFRP2 : $12,18 \pm 4,66$ % versus $29,17 \pm 4,24$ %, $P = 0,028$ et $P > 0,05$ $n=4$).



Résultats

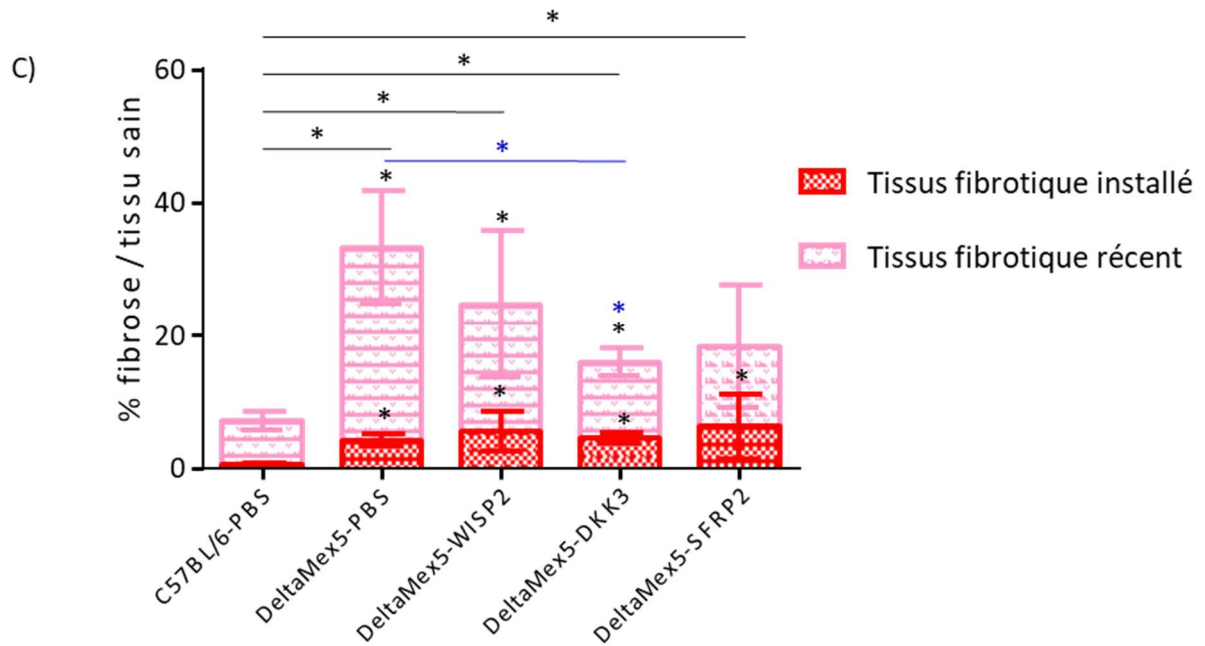


Figure 89 : Caractérisation histologique du cœur après traitement par AAV9-hTnt2-hWISP2, DKK3 ou SFRP2 des souris DeltaMex5.

A) Coloration en HPS du cœur. B) Coloration en rouge Sirius du cœur. Echelle, 500 μ m. C) Quantification de la proportion des types de fibrose comparées au tissu sain. Test de Student.

IV.B.4.c. Evaluation fonctionnelle

Les analyses échographiques de la fonction cardiaque et de la dilatation ventriculaire ne montrent pas de modification des paramètres chez les souris injectées par AAV9-hTnt2-hWISP2, DKK3 et SFRP2 par rapport aux souris injectées en PBS (Figure 90). Seule la masse du ventricule gauche est significativement diminuée de 30% chez les souris injectées par le vecteur AAV9-hTnt2-DKK3 ($133,34 \pm 8,44$ mg, $n=4$, versus $190 \pm 12,77$ mg, $n=8$, $P= 0,01$).

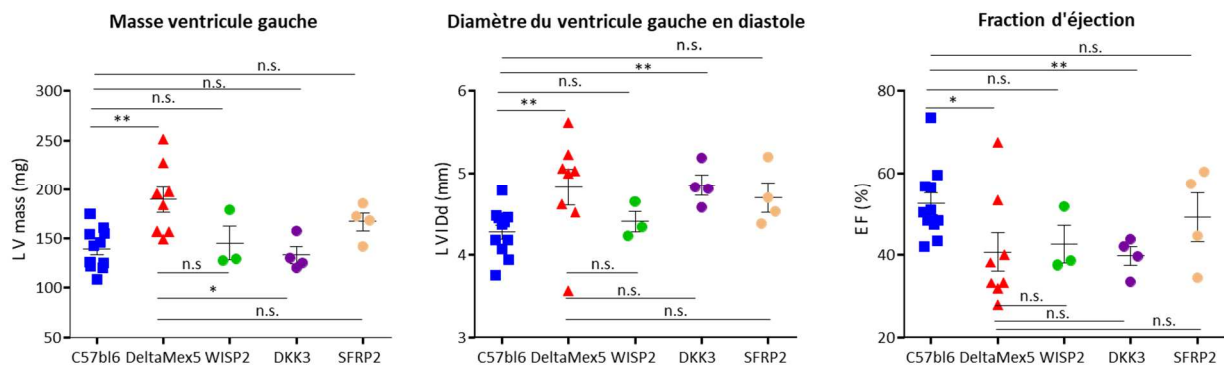


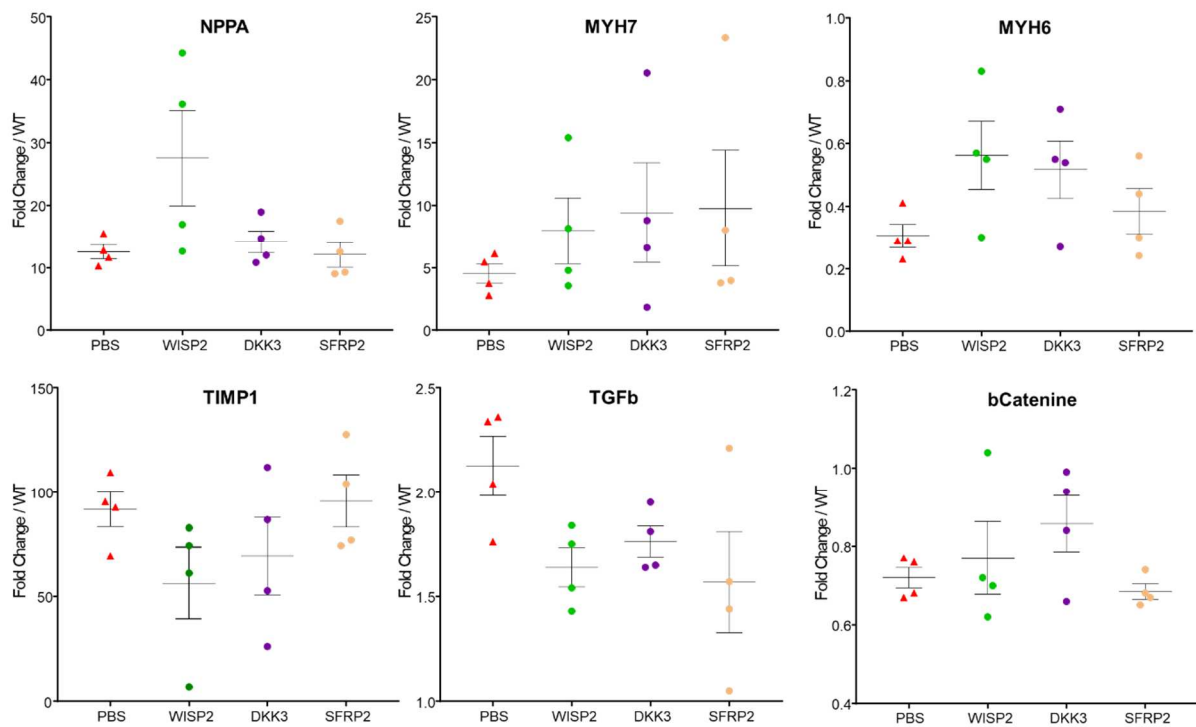
Figure 90 : Comparaison des marqueurs de la DCM mesurés en échographie entre les souris C57BL/6, les souris DeltaMex5 et les souris DeltaMex5 injectées par les vecteurs WISP2, DKK3 et SFRP2.

Test de Mann-Whitney.

Résultats

IV.B.4.d. Evaluation moléculaire

Les marqueurs de l'atteinte cardiaque et de la fibrose évalués en RT-qPCR pour le cœur des souris injectées par l'AAV9-hTnt2-hWISP2 ne sont pas modifiés par rapport aux souris injectées en PBS (Figure 91). Il est intéressant d'observer que pour tous les marqueurs, la souris montrant la meilleure restauration des ratios par rapport aux souris C57BL/6 est la souris présentant le taux de hWISP2 le plus élevé. Aucun marqueur n'est significativement modifié dans le cœur des souris injectées par l'AAV9-hTnt2-DKK3. Dans le cœur des souris injectées par l'AAV9-hTnt2-hSFRP2, aucun marqueur n'est non plus significativement modifié. Pour la plupart des marqueurs la variabilité entre les différentes souris est très importante. Encore une fois il est observé que pour tous les marqueurs, la souris montrant la meilleure restauration des ratios par rapport aux souris C57BL/6 est la souris présentant le taux de transgène le plus élevé.



Résultats

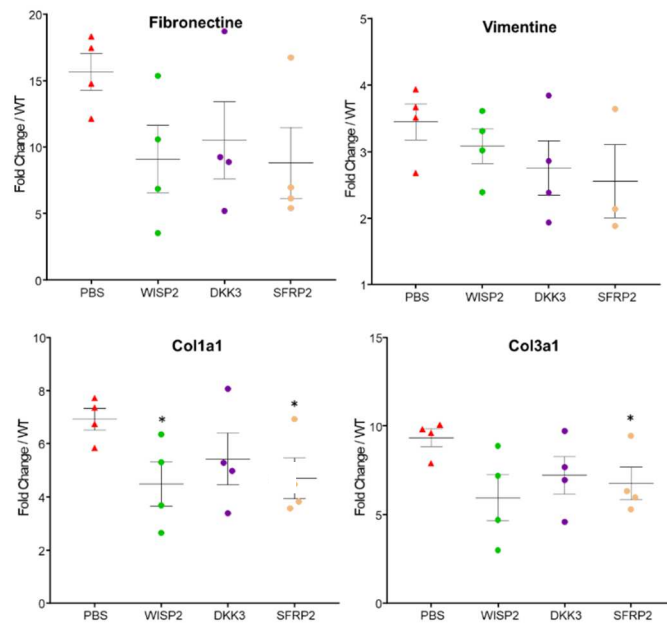


Figure 91 : Mesure RT-qPCR de différents marqueurs ARN de l'atteinte cardiaque et fibrotique dans l'étude WNT.

Mesures exprimées en ratio par rapport aux souris C57BL/6. Test de Mann-Whitney.

IV.B.5. Conclusion

Le tableau suivant récapitule l'ensemble des modifications observées avec les différentes approches. A l'exception de WISP2, toutes les autres approches montrent un effet positif sur au moins un critère. Cependant, aucune d'entre elles ne corrige l'ensemble des paramètres de la cardiomyopathie.

Tableau 18 : Résultats de la modulation des voies WNT et TGF- β .

	CILP	shCILP	shLTBP2	WISP2	DKK3	SFRP2
<i>Masse souris</i>	↘	↘	=	=	=	=
<i>Hypertrophie cardiaque</i>	=	↘	=	=	=	=
<i>Fibrose</i>	↘	↘	↘	=	↘	↘
<i>Masse LV</i>	=	↘	↘	=	↘	=
<i>Dilatation ventriculaire</i>	=	=	=	=	=	=
<i>Fonction cardiaque</i>	=	=	=	=	=	=
<i>Marqueurs ↗</i>	/	<i>Myh7, Myh6, β Cat</i>	<i>Myh6, β Cat</i>	/	/	/
<i>Marqueurs ↘</i>	<i>Tgf-β1, Fn, Vim, Col1a1</i>	<i>Timp1, Vim</i>	<i>Timp1, Tgf-β1, Fn, Vim, Col1a1</i>	<i>Tgf-β1, Col1a1</i>	/	<i>Col1a1, Col3a1</i>

IV.C. Approches complémentaires en transfert de gène

En supplément de ces candidats que nous avons identifiés par l'analyse RNAseq, nous avons voulu également tester d'autres approches de modulation génique que nous avons identifiées par une analyse bibliographique comme ayant un effet positif sur les atteintes cardiaques. Les candidats sélectionnés sont le gène Nrf2 pour son rôle antioxydant, puis les micros ARN miR-101a, miR-133a, miR-384-5p et miR-590 pour leurs potentiels rôles de régulation de l'atteinte cardiaque. Des vecteurs AAV de surexpression ont été générés et injectés chez la souris DeltaMex5 pour une analyse histologique et fonctionnelle.

IV.C.1. Surexpression du facteur de transcription antioxydant Nrf2

Le Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NFE2L2 ou Nrf2) est un facteur de transcription ubiquitaire principalement impliqué dans la protection contre le stress oxydatif et l'inflammation (Baird and Dinkova-Kostova, 2011). Le stress oxydatif est impliqué dans l'activation des fibroblastes et la production de collagène dans la fibrose cardiaque (Wang et al., 2017) et plusieurs études ont montré que l'activation de Nrf2 pourrait diminuer la fibrose notamment en inhibant la voie ROS/TGF β 1/Smad2/3 (Cai et al., 2018; Chen et al., 2019; Xian et al., 2020). La dégradation de Nrf2 a également été liée à un phénotype de cardiomyopathie dilatée chez la souris (Jiang et al., 2018). De façon intéressante, il a été montré que Nrf2 était un activateur de la voie de signalisation PPAR γ , qui est diminuée dans notre modèle et régulée négativement par les voies TGF- β et WNT (Lee, 2017). Nous avons donc voulu évaluer l'effet de sa surexpression sur le modèle DeltaMex5 en utilisant un AAV9-tnnt2-mNRF2 selon le même protocole que nos gènes candidats : injection des souris DeltaMex5 à 1 mois, et échographie et prélèvement à 4 mois, après 3 mois d'expression du vecteur à une dose de $2^{\circ}11$ vg/souris.

IV.C.1.a. Evaluation morphologique

La masse des souris n'est pas significativement diminuée chez les souris traitées par le vecteur NRF2 après 3 mois ($33,13 \pm 2,15$ g, versus $34,9 \pm 1,3$ g, $n=8$) mais n'est plus supérieure à celle des souris contrôle C57BL/6 ($28,81 \pm 0,72$, $n=11$, $P > 0,05$) (Figure 92). En revanche, l'hypertrophie du cœur est diminuée : le ratio de la masse du cœur sur la masse totale de la souris est significativement diminué chez les souris DeltaMex5 traitées par Nrf2 en comparaison avec les souris DeltaMex5 non traitées ($0,51 \pm 0,02$, $n=4$ versus $0,63 \pm 0,02$ %, $n=8$, $P = 0,027$) (Figure 92).

Résultats

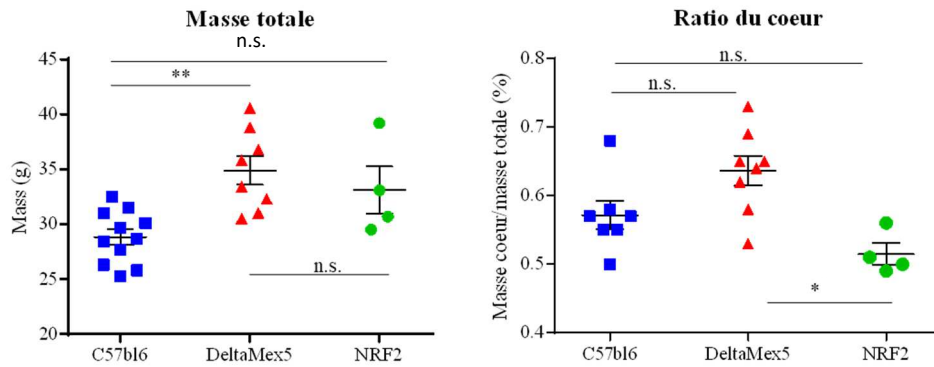


Figure 92 : Masse totale des souris en fonction du groupe et ratio de la masse du cœur en fonction de la masse totale de la souris (%).

Test de Mann-Whitney.

Les analyses histologiques effectuées sur le cœur des souris avec une coloration HPS révèlent une nette diminution du tissu lésé chez les souris traitées (Figure 93A). La coloration au rouge Sirius démontre encore la présence de tissu fibrotique dans le cœur des souris traitées, mais en quantité moins importante (Figure 93B). La quantification de la fibrose totale dans les tissus par la coloration du collagène au rouge Sirius confirme que le taux de fibrose est diminué dans le cœur des souris DeltaMex5 traitées en comparaison du cœur des souris DeltaMex5 non traitées ($8,74 \pm 1,85 \%$ versus $18,68 \pm 1,74 \%$, $P = 0,0078$, $n = 4$), bien qu'il reste toujours supérieur au taux de fibrose du cœur des souris C57BL/6 ($2,08 \pm 0,17 \%$, $P = 0,0115$, $n = 4$) (Figure 93C).

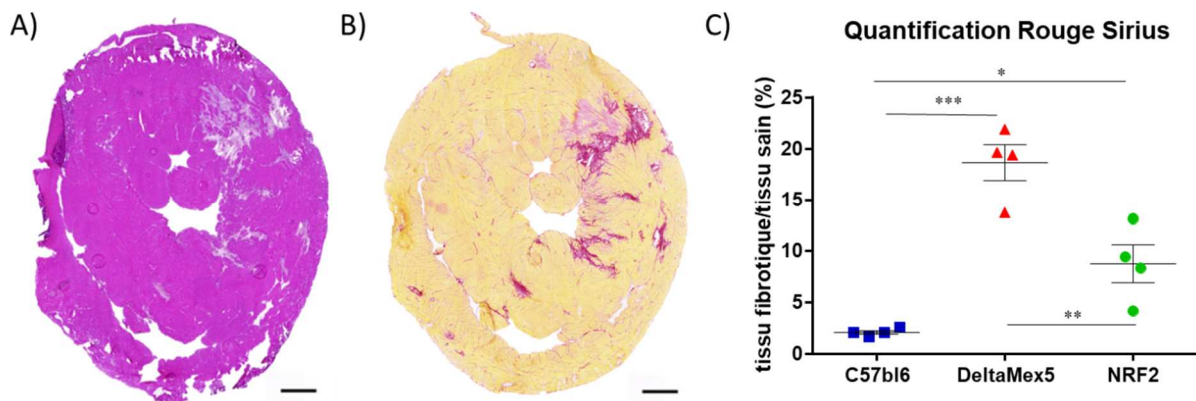


Figure 93 : Caractérisation histologique du cœur après traitement par AAV9-tnnt2-NRF2 des souris DeltaMex5.

A) Coloration en HPS du cœur. B) Coloration en rouge Sirius du cœur. Echelle, 500 μ m. C) Quantification de la proportion de rouge Sirius comparée au tissu sain. Test de Student.

IV.C.1.b. Evaluation fonctionnelle

Les analyses échographiques de la fonction cardiaque ont montré que contrairement aux résultats obtenus au niveau histologique, où une diminution de la fibrose est observée, la dilatation du ventricule et la fonction cardiaque ne sont pas améliorées par le traitement (Figure 94). En effet, le

Résultats

diamètre du ventricule gauche en diastole chez les souris DeltaMex5 injectées par le vecteur AAV9-Nrf2 reste sensiblement identique à celui des souris DeltaMex5 non traitées ($4,70 \pm 0,08$ mm, $n=4$ versus $4,83 \pm 0,22$ mm, $n = 8$, $P > 0,05$), et reste significativement différent des souris C57BL/6 ($4,28 \pm 0,09$ mm, $n=11$, $P = 0,02$). La fraction d'éjection cardiaque, qui est représentative de la fonction du ventricule gauche, reste faible ($40,66 \pm 2$ % versus 41 ± 5 %, $n=4$ et 8) et significativement inférieure à la fraction d'éjection des souris C57BL/6 (53 ± 3 %, $n=11$, $P = 0,02$). En revanche, l'hypertrophie du ventricule gauche est réduite, la masse du ventricule gauche est ainsi diminuée de 40 % ($133,3 \pm 6,377$ mg, $n=4$, versus $190 \pm 12,77$ mg, $n=8$, $P < 0,05$).

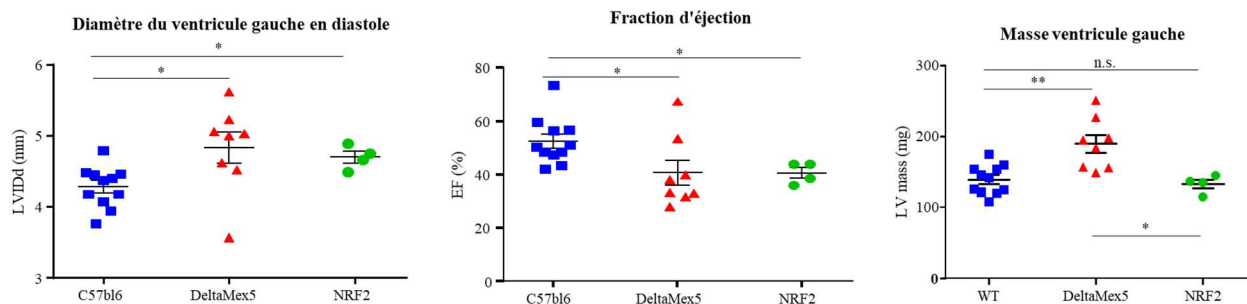


Figure 94 : Comparaison des marqueurs de la DCM mesurés en échographie entre les souris C57BL/6, les souris DeltaMex5 non injectées et les souris DeltaMex5 surexprimant Nrf2.
Test de Mann-Whitney.

IV.C.1.c. Conclusion

La surexpression du gène Nrf2 dans notre modèle grâce à l'utilisation d'un vecteur viral AAV9 et d'un promoteur cardiaque a montré une amélioration significative de la fibrose cardiaque et de l'hypertrophie du cœur. En revanche, la fonction cardiaque et le volume du ventricule gauche ne sont pas améliorés par la surexpression de Nrf2.

IV.C.2. Les micro ARN

Nous avons également voulu évaluer l'effet de différents micro ARN sur le modèle DeltaMex5. Les micro ARN sont des petits ARN non codants qui contrôlent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel. Ils diminuent l'expression des gènes en s'appariant avec l'ARNm cible, provoquant ainsi l'inhibition de la traduction ou la dégradation de leur cible. Les miR-101a, miR-133a, miR-384-5p et miR-590 ont été choisis de par leur potentiel rôle cardio-protecteur. Le miR-101a est un inhibiteur de la voie TGF- β et a démontré un rôle anti-fibrotique dans le cœur en inhibant la prolifération des cardio-fibroblastes, en diminuant la production de collagène et en augmentant l'autophagie dans plusieurs modèles d'insuffisance cardiaque (Zhou et al., 2018) (Zhao et al., 2015). La surexpression du miR-101a dans un modèle d'infarctus chez le rat a montré une amélioration de la fonction cardiaque

et une diminution de la fibrose (Pan et al., 2012). Le miR-133a est particulièrement enrichi dans le cœur où il a un rôle protecteur de la fonction cardiaque. Il est impliqué dans le développement et la prolifération des cardiomyocytes et dans la conduction cardiaque. Le miR-133a a un effet anti-apoptotique en ciblant Cas9, il régule également l'hypertrophie cardiaque en ciblant RhoA, Cdc42 et Nelf-A/WHSC2, et la fibrose en ciblant Snai1, Ctgf et Col1a1 (Carè et al., 2007; Izarra et al., 2014; Sang et al., 2015). Le mir-133a a également été montré comme diminué chez les patients atteints de cardiomyopathie dilatée, et les niveaux plus faibles de miR-133a sont corrélés avec une dysfonction du ventricule gauche et une plus forte présence de fibrose cardiaque (Rubiś et al., 2018) (Besler et al., 2016). Le miR-384-5p est un régulateur clé dans le circuit de transactivation entre TGF- β et WNT durant l'activation des fibroblastes cardiaques et la surexpression du mirR-384 diminue la fibrose après un infarctus dans un modèle rat (Seo et al., 2019). Le miR-590 cible le remodelage cardiaque. Sa surexpression promeut la prolifération des cardiomyocytes et inhibe l'apoptose *in vivo* dans un modèle d'infarctus (Eulalio et al., 2012) (Zhao et al., 2019). Les AAV9-miR ont été injectés selon le même protocole que nos gènes candidats : injection des souris DeltaMex5 à 1 mois, et échographie et prélèvement à 4 mois, après 3 mois d'expression du vecteur à une dose de 2×10^{11} vg/souris.

IV.C.2.a. Evaluation morphologique

La masse des souris n'est pas significativement diminuée chez les souris traitées par les miRs après 3 mois d'expression, hormis pour le miR-590 dont la masse est diminuée ($26,05 \pm 2,81$ g, n=4 versus $34,9 \pm 1,31$ g, n=8, $P = 0,008$). Une tendance à la diminution de la masse semble tout de même être observée, et les masses ne sont plus significativement différentes des souris contrôle C57BL/6. Cependant, les souris injectées avec le miR-contrôle (un vecteur avec un miR « scramble »), voient également leur masse diminuer (Figure 95). L'hypertrophie du cœur a également tendance à diminuer et le ratio de la masse du cœur sur la masse totale de la souris est significativement diminué chez le souris DeltaMex5 traitées par le miR-101a ($0,50 \pm 0,05$ %, n=4, $P = 0,015$) et le miR-384-5p ($0,54 \pm 0,02$ %, n=4, $P = 0,017$) en comparaison avec les souris DeltaMex5 non traitées ($0,63 \pm 0,02$ %, n=8) (Figure 95).

Résultats

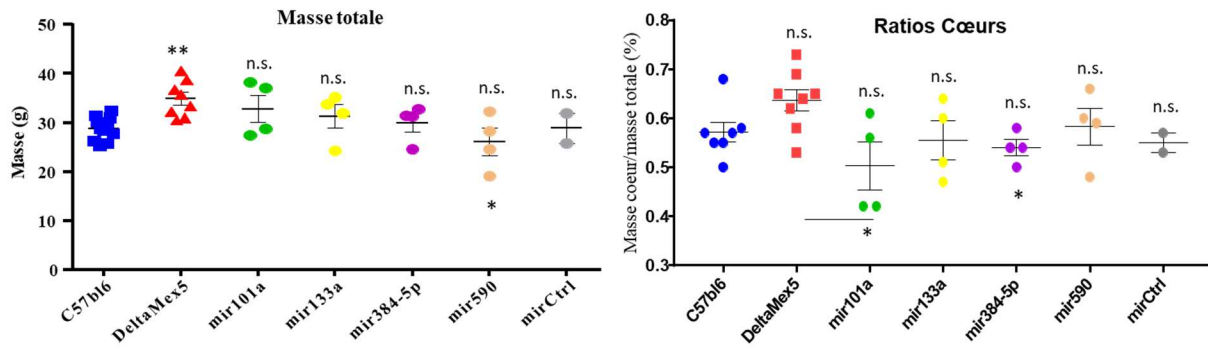
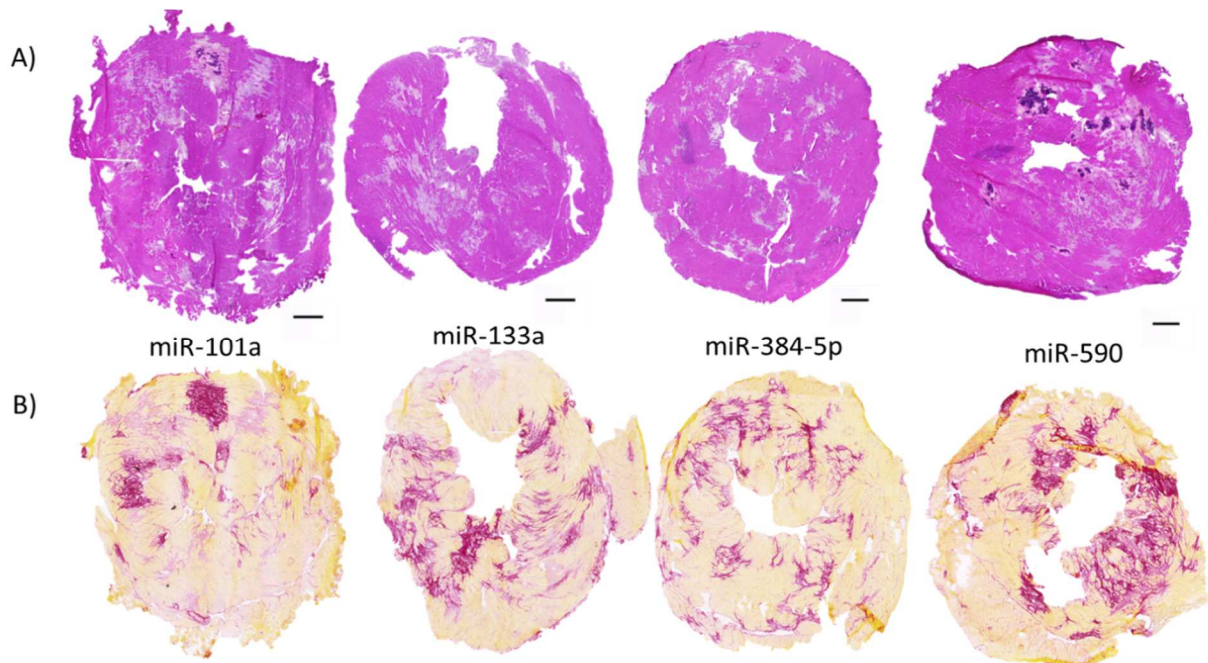


Figure 95 : Masse totale des souris en fonction du groupe et ratio de la masse du cœur en fonction de la masse totale de la souris (%).

Test de Mann-Whitney.

Les analyses histologiques ont ensuite été effectuées sur le cœur des souris. La coloration HPS révèle une persistance du tissu lésé chez les souris traitées et l'apparition chez certaines souris, indépendamment du micro ARN injecté, de calcifications, comme ici sur le cœur injecté par le miR-590 (Figure 96A). La coloration au rouge Sirius démontre la présence de tissus fibrotiques dans le cœur des souris traitées en quantité importante (Figure 96B), ce qui est confirmé par la quantification de la fibrose totale dans les tissus par la coloration du collagène au rouge Sirius : les taux de fibrose dans le cœur des souris DeltaMex5 traitées sont équivalents à ceux des souris DeltaMex5 non traitées, avec une tendance à la hausse, et nettement supérieurs au taux de fibrose du cœur des souris C57BL/6 (Figure 96C).



Résultats

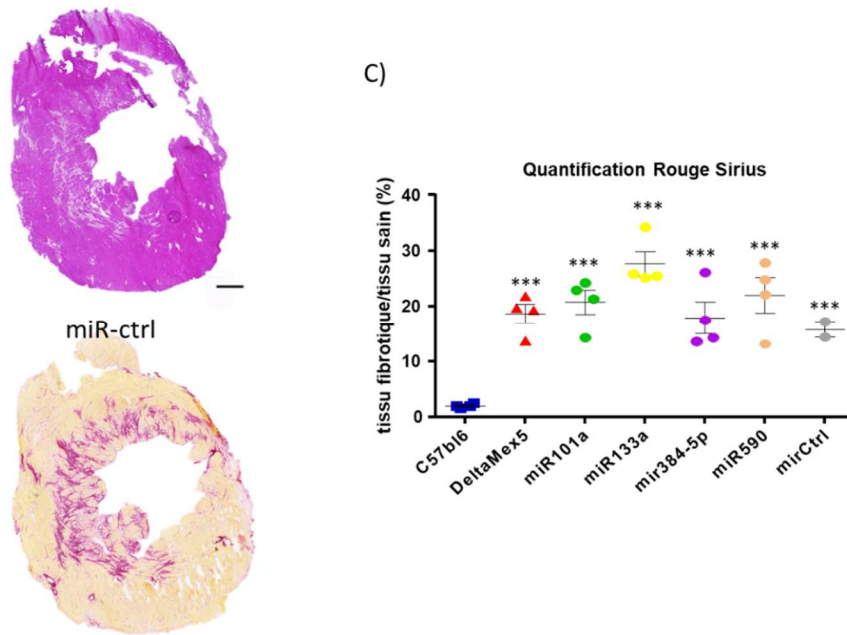


Figure 96 : Caractérisation histologique du cœur après traitement par les vecteurs micro ARN miR-101a, miR133a, miR384 et miR590 des souris DeltaMex5.

A) Coloration en HPS du cœur. B) Coloration en rouge Sirius du cœur. Echelle, 500 μ m. C) Quantification de la proportion de rouge Sirius comparée au tissu sain. Test de Mann-Whitney.

IV.C.2.b.Evaluation fonctionnelle

Enfin, les analyses par échographie de la fonction cardiaque ont été effectuées. La dilatation du ventricule gauche, mesurée par le diamètre du ventricule gauche en diastole, chez les souris DeltaMex5 injectées par les micro ARN diminue pour tous les micro ARN et n'est plus significativement différente du diamètre du ventricule gauche des souris C57BL/6, mais le diamètre est également diminué pour le micro ARN contrôle. En revanche la fonction du ventricule gauche avec la fraction d'éjection cardiaque, reste faible et significativement inférieure à la fraction d'éjection des souris C57BL/6 pour tous les groupes (Figure 97).

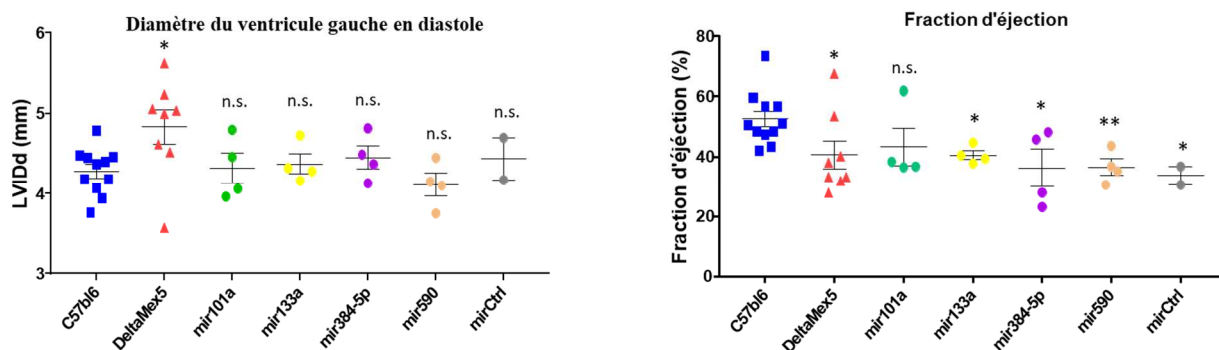


Figure 97 : Comparaison des marqueurs de la DCM mesurés en échographie entre les souris C57BL/6, les souris DeltaMex5 non injectées, injectée par un miR-contrôle et les souris DeltaMex5 sur exprimant les différents micro ARN.

Test de Mann-Whitney.

IV.C.2.c. Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus pour le transfert de gène utilisant les micro ARN n'a pas donné de résultats concluants : la fibrose semble augmentée dans le cœur des souris traitées et la fonction du ventricule gauche, évaluée par la fraction d'éjection du cœur reste faible. Seuls la dilatation du ventricule gauche, mesurée par le diamètre de ce dernier, le poids des souris et l'hypertrophie cardiaque sont améliorés, mais ils le sont également pour le vecteur miR-contrôle, ainsi ces améliorations ne seraient pas spécifiques des micro ARN. Au vu des résultats histologiques et fonctionnels négatifs, les analyses d'expression des miRs et de leurs cibles n'ont pas été effectués.

IV.C.3. Conclusion

Le tableau suivant récapitule l'ensemble des modifications observées avec les différentes approches. Seule l'approche NRF2 montre une amélioration de la fibrose cardiaque, et aucune des approches n'améliore les paramètres fonctionnels ou la dilatation ventriculaire.

Tableau 19 : Résultats de la modulation de NRF-2 et des miR.

	NRF2	miR101a	miR133a	miR-384	miR-590
<i>Masse souris</i>	=	=	=	=	↘
<i>Hypertrophie cardiaque</i>	↘	↘	=	↘	=
<i>Fibrose</i>	↘	=	↗	=	=
<i>Masse LV</i>	↘	↘	↘	=	↘
<i>Dilatation ventriculaire</i>	=	=	=	=	=
<i>Fonction cardiaque</i>	=	=	=	=	=

DISCUSSION ET CONCLUSION

I. Caractérisation du modèle DeltaMex5

I.A. L'atteinte cardiaque du modèle DeltaMex5 est caractérisée par une cardiomyopathie dilatée

La caractérisation du modèle murin DeltaMex5 a montré un phénotype cardiaque qui nous a permis de définir le modèle comme un modèle de cardiomyopathie dilatée. Le modèle présente, en effet, les caractéristiques d'une cardiomyopathie dilatée avec un remodelage cardiaque important qui entraîne l'apparition des paramètres principaux de la DCM que sont la dysfonction systolique et la dilatation du ventricule gauche.

Le remodelage cardiaque dans le modèle DeltaMex5 est visible à toutes les échelles d'observation. Tout d'abord au niveau macroscopique, le cœur tend visiblement à être hypertrophié. A l'histologie en HPS, une atteinte globale du tissu est observée avec de large zones de tissus détruits, un remplacement fibrotique et des infiltrats cellulaires. Au niveau cellulaire, les cardiomyocytes sont altérés comme montré par l'analyse de certains marqueurs d'atteinte. Se retrouve en effet l'induction de gènes comme le facteur natriurétique atrial (NPPA) dont l'expression est particulièrement augmentée, et qui est un marqueur sécrété par les cardiomyocytes en réponse à une dysfonction du ventricule gauche. Les différentes myosines cardiaques, la β -MyHC ventriculaire lente (MYH7) et l' α -MyHC atriale rapide (MYH6) ont une balance déséquilibrée en faveur de MYH7, déséquilibre connu pour diminuer la contractilité des cardiomyocytes. En microscopie électronique, il est observé que les sarcomères ont une taille moins régulière et que les différentes bandes les composant sont moins bien définies et irrégulières, bien que la taille moyenne des sarcomères reste égale aux souris C57BL/6. La présence de cellules inflammatoires est également observée en microscopie électronique, marquant une inflammation persistante. Au sein des cardiomyocytes, une atteinte des mitochondries est également observée. Notamment en microscopie électronique, la présence de nombreuses mitochondries d'apparence anormale ainsi que de nombreuses vacuoles autophagiques et non autophagiques a été notée. L'étude ARN des mitochondries révèle également une augmentation des marqueurs mitochondriaux de l'apoptose cellulaire et une dérégulation des marqueurs du transport mitochondrial. A noter que le métabolisme global semble également atteint : la masse des souris a

tendance à être supérieure et au prélèvement les souris DeltaMex5 présentent un tissu graisseux important. Il resterait à définir le lien entre cette observation, le défaut génétique et les perturbations mitochondriales observées.

L'atteinte des cardiomyocytes est associée à la présence d'un important tissu fibrotique. En effet, l'altération des cardiomyocytes entraîne l'expansion de la fibrose qui remplace les cardiomyocytes nécrosés. Les fibroblastes prolifèrent et se différencient en proto-myofibroblastes puis en myofibroblastes, plus mobiles et plus contractiles avec une plus grande capacité de synthèse de la MEC. Ce tissu fibrotique est observé par la coloration du collagène en Rouge Sirius qui révèle la présence d'une fibrose progressive dans le cœur. Cette fibrose est interstitielle mais surtout de remplacement, formant des gros patchs fibrotiques. La fibrose est également observée en microscopie électronique avec la présence de fibres de collagène. L'accumulation excessive des composants de la matrice extra cellulaire est également observée en ARN, avec une augmentation progressive des collagènes 1 et 3, de la fibronectine et de la vimentine, mais également des marqueurs pro-fibrotiques *Timp1* et *Tgf- β 1* sécrétés par les myofibroblastes.

De façon intéressante, l'observation de la coloration Rouge Sirius a permis de différencier deux types de prise de la coloration, une prise partielle et une prise complète. Selon notre analyse en immuno-histo fluorescence, les deux types de prise correspondent respectivement à une fibrose de type intermédiaire, caractérisée par de nombreux fibroblastes résidents différenciés en myofibroblastes, et des protéines de la MEC sous leur forme intracellulaire et à une fibrose installée, comportant majoritairement de la matrice extracellulaire acellulaire. La fibrose intermédiaire augmente, puis elle est remplacée dans le temps par la fibrose tardive.

La dégénérescence des cardiomyocytes, l'induction des myofibroblastes et l'accumulation de la MEC entraînent une hypokinésie du myocarde qui est visible par une diminution de la fraction d'éjection à l'échographie à partir de 3 mois dans le cœur des souris DeltaMex5 et par une diminution de l'élastance donc de l'inotropie cardiaque. La structure cardiaque est modifiée en compensation de la diminution de la fonction cardiaque afin d'augmenter le volume sanguin éjecté. Ceci se traduit dès 4 mois par une augmentation progressive du diamètre du ventricule gauche observé *in vivo* à l'échographie, mais également sur les tissus entiers par microscopie à feuille de lumière, ainsi que par une augmentation de la masse et du volume du ventricule gauche, et un amincissement des parois ventriculaires.

I.B. Le phénotype musculaire du modèle est limité

La caractérisation du modèle a également été effectuée au niveau musculaire, et révèle la présence d'un phénotype dystrophique, mais moins important en comparaison du phénotype cardiaque : le tissu est lésé mais la fonction musculaire reste préservée, voire augmentée.

Nous avons choisi d'étudier le muscle soléaire, le muscle tibial antérieur et le muscle long extenseur des orteils, car ils possèdent des caractéristiques métaboliques différentes chez la souris. Le muscle soléaire est composé presque exclusivement de fibres de type I, qui sont des fibres lentes. Il se contracte de façon prolongée avec peu d'intensité. Le TA et l'EDL sont composés majoritairement de fibres de type II, les fibres rapides, et sont donc plus adaptés à des efforts intenses et de courte durée. De plus, leur ratio d'isoformes de la Titine est également différent : le muscle soléaire contient majoritairement de la titine exprimant l'exon Mex5, tandis que le TA et l'EDL expriment les deux isoformes avec et sans l'exon Mex5 (Charton et al., 2016).

L'étude a montré que ces différents muscles n'étaient pas atteints de la même façon. A l'histologie, un phénotype musculaire est observé uniquement dans le muscle soléaire, qui montre une importante présence de noyau centro-nucléaires, et donc la mise en place d'un processus de dégénération/régénération qui est confirmé par la présence de marqueurs transcriptionnels de la régénération tissulaire dans les SOL. La présence de fibrose est également observée en grande quantité uniquement dans les soléaires. La présence de noyaux centro-nucléés et de la fibrose est également confirmée par l'observation en microscopie électronique du soléaire. Cette dernière révèle également une atteinte des fibres musculaires avec la présence de fibres d'aspect anormal, de sarcomères irréguliers, de triades dilatées, d'une atteinte mitochondriale et de vacuoles autophagiques et non autophagiques. L'atteinte musculaire est donc en lien avec la proportion d'isoformes de la titine Mex5+ naturellement présent dans le muscle. Une différence de partenaires de la titine entre les différents types de fibres musculaires n'a à ce jour pas été décrite. Cependant, le domaine is7 codé par l'exon Mex5 est inclus dans un site de liaison à la calpaïne 3, protéase proposée comme ayant un rôle dans la plasticité musculaire (Duguez et al., 2006). Il est donc possible que les muscles de type lent comme le soléaire aient un besoin impératif des régulations liées à l'action de la calpaïne 3 alors que cette fonction est plus accessoire dans les muscles rapides. L'atteinte spécifique du cœur et du muscle soléaire pourrait être en lien avec leur métabolisme préférentiellement de type aérobie, à l'inverse de muscles composés de fibres musculaires de type rapide qui ont un métabolisme préférentiellement anaérobie.

Au niveau fonctionnel, la délétion de l'exon Mex5 ne semble pas avoir d'impact délétère sur la force de contraction musculaire et l'élasticité du SOL ou de l'EDL malgré l'atteinte histologique. On peut même noter de façon surprenante que les muscles DeltaMex5 semblent pouvoir générer plus de force lors d'un test de résistance à un effort prolongé mené à l'âge de 2 mois que les muscles sains (à un temps précoce pour les EDL et un temps tardif pour les soléaires). Une étude préliminaire effectuée à l'âge de 6 mois donne les mêmes résultats, à savoir une tendance vers une force supérieure chez les souris DeltaMex5. De plus, les résultats de l'étude précédente sur le modèle montraient déjà une conservation de la force musculaire et des paramètres contractiles (Charton et al., 2016). Il serait nécessaire de mener des études supplémentaires pour comprendre l'origine de ce phénomène qui pourrait prendre source soit au niveau d'une modification structurelle et mécanique de la titine, soit par l'intermédiaire d'une modification de l'interaction avec des partenaires.

I.C. Analyse protéique de la titine

Dans le muscle comme dans le cœur, le ratio de la quantité de titine en comparaison de la myosine reste inchangé par rapport aux souris normales. Dans le cœur, les différents isoformes de la titine conservent également les mêmes ratios avec cependant une tendance non significative de la diminution de l'isoforme N2BA compensée par une augmentation de N2B dans le modèle DeltaMex5. Ainsi, la délétion de Mex5 n'a pas d'impact sur la présence de la titine totale dans les muscles.

La détection en Western Blot des domaines carboxy-terminaux de la titine dans les muscles (SOL, TA et EDL) et dans les cœurs DeltaMex5 montre que la quantité de la titine en début de la ligne M reste inchangé jusqu'au domaine is6. Cependant, les intensités de marquage en Western Blot des domaines M8M9 et M10 qui encadrent le domaine is7 absent dans le modèle, sont diminués de près de 75 % chez les souris DeltaMex5. Chez les souris hétérozygotes pour la mutation DeltaMex5, les ratios des isoformes M8M9 et M10 sont également diminués de près de 50 % dans le cœur, suggérant une perte des domaines terminaux de la titine à partir de M8M9 dans le modèle. Cependant, la vérification sur les données de RNAseq de l'intégrité des exons finaux de la titine dans le génome de la souris DeltaMex5 confirme la présence des domaines Mex4 et Mex6 entourant l'exon Mex5 délété, indiquant que cette diminution correspondrait à une modification post-transcriptionnelle. Le marquage en immuno-histo fluorescence de M8M9 et de M10 permet de confirmer la présence de ces domaines de la ligne M dans le sarcomère. En microscopie électronique, les marquages M8M9 et M10 sont bien présents, mais plus irréguliers dans le cœur des souris DeltaMex5. La distance entre les épitopes à travers la ligne M augmente pour M8M9 et a tendance à diminuer pour M10. Ces résultats indiquent la présence des derniers domaines immunoglobuline de la titine de chaque côté du domaine

Discussion et Conclusion

is7 qui lui est bien absent, mais suggèrent une déstabilisation de l'extrémité carboxy-terminale de la titine et/ou un changement de conformation de cette dernière. Une conséquence possible des modifications induites serait une mauvaise fixation des anticorps sur les domaines M8M9 et M10 dans les Western blot en raison de changement de conformation. Les résultats de microscopie électronique peuvent laisser penser que l'extrémité de la Titine dans la ligne M n'est plus linéaire après la délétion d'is7. Le domaine is7 est constitué à plus de 30 % de sérine, ce qui est prédit comme pouvant conférer une flexibilité entre les deux domaines immunoglobuline M8M9 et M10 (Carlsson and Thornell, 1987). La délétion du domaine peut donc impacter l'organisation structurale de la titine à cet endroit. Il serait intéressant d'étudier la structure 3D de la région terminale de la titine afin de mieux comprendre l'effet de la délétion de l'exon Mex5 sur la structure de la titine et de visualiser un potentiel changement dans sa conformation

Dans la région carboxy-terminale, deux molécules de titine se chevauchent et servent d'ancrage pour les filaments épais de myosine et les autres composants de la ligne M. Ainsi une déstabilisation ou un changement d'organisation de cette extrémité C-ter de la titine pourrait avoir des conséquences sur les autres protéines présentes au niveau de la ligne M du sarcomère. En lien avec cette hypothèse, la liaison entre le domaine M10 et ses partenaires est modifiée dans le tissu cardiaque. Le domaine M10 de la titine se lie à plusieurs protéines : l' α -synémine, la myosprine et l'obscurine. Les marquages immuno-histo fluorescents de ces protéines ont montré des différences dans les tissus DeltaMex5 en comparaison des C57BL/6. L' α -synémine présente un marquage homogène et intact, mais l'obscurine et la myosprine montrent un marquage très diminué. L' α -synémine est une protéine des filaments intermédiaires, et forme des complexes avec la desmine et la vimentine. Elle se lie également aux protéines costamériques et aux protéines du sarcolemme, comme l' α -actinine, la vinculine et les protéines du complexe dystroglycane (Prudner et al., 2014). Il est possible donc que l'engagement de l' α -synémine avec la titine soit minoritaire par rapport à ses autres interactions, ce qui expliquerait l'absence de perturbation visible dans cette analyse. L'obscurine est une protéine sarcomérique interagissant avec la titine, la myoméline et l'ankyrine 1 (Fukuzawa et al., 2008). Elle a un rôle structural indispensable de liaison de la ligne M du sarcomère au réticulum endoplasmique (Lange et al., 2009). Différentes mutations sur le gène de l'obscurine ont été identifiées comme responsables de cardiomyopathie dilatées (Marston et al., 2015). La myosprine est encodée par le gène *CMYA5* (pour *Cardiomyopathy-associated gene 5*) et sa mutation a été associée à des pathologies cardiaques (Xu et al., 2015). Dans le cœur, la myosprine fait partie d'un complexe multiprotéique avec le récepteur de la ryanodine RyR2 (Benson et al., 2017), or la dérégulation des échanges calciques médiés par les RyR est responsable d'anomalies du couplage excitation-contraction dans le cœur. Il semble donc que l'absence du domaine is7 puisse conduire à

une déstabilisation / un changement structurel de la bande M de la titine qui impacte l'organisation du sarcomère dans le cœur en modifiant la liaison de la titine avec ses partenaires.

L'apparition d'un phénotype cardiaque dans le modèle DeltaMex5 pourrait être due à une déstabilisation globale de la ligne M et du sarcomère au sein des cardiomyocytes contractiles. Cependant, le mécanisme semble différent entre le modèle murin et l'Homme. En effet, les rares cas observés de mutation sur l'exon Mex5 n'entraînent pas de cardiomyopathie chez les patients (Evila et al., 2017). Les mutations sur l'exon Mex5 et Mex6 entraînent une perte de fin de la bande M et une LGMD2J lorsque la mutation est homozygote, qui ne présente pas de phénotype cardiaque mais principalement un phénotype musculaire (Hackman et al., 2008). Par contre, des mutations tronquantes entraînant une délétion plus large de la ligne M chez l'Homme entraînent un phénotype cardiaque sévère avec une mortalité précoce des patients (Carmignac et al., 2007). D'autre part, il a été montré chez des patients présentant une DCM liée à la titine, l'altération du métabolisme énergétique cardiaque et de la fonction mitochondriale associés à un stress oxydatif et à de la fibrose interstitielle (Verdonschot et al., 2018), qui corrélerent avec le phénotype observé dans notre modèle. Bien que la délétion de l'exon Mex5 n'ait pas les mêmes conséquences chez l'Homme, le phénotype qui en découle permet de reproduire une atteinte de type DCM retrouvée dans les titinopathies. Son étude pourrait permettre de mieux comprendre leurs mécanismes et ainsi de proposer des pistes pour leur traitement.

II. Caractérisation du modèle DBA/2-mdx

Chez les patients atteints de myopathie de Duchenne, le phénotype cardiaque est retrouvé sous la forme d'une cardiomyopathie dilatée dès l'adolescence (Gao and McNally, 2015). La mort des cardiomyocytes entraîne l'apparition progressive d'un tissu fibrotique après 15 ans (Finsterer and Stöllberger, 2003). Le principal modèle murin utilisé pour l'étude de la myopathie de Duchenne est le modèle mdx sur un fond C57BL/10, qui présente une forme spontanée de dystrophie musculaire due à une mutation ponctuelle sur l'exon 23 du gène de la dystrophine (Bulfield et al., 1984). Le modèle mdx reflète bien l'atteinte musculaire retrouvée chez les patients, mais il ne présente qu'une atteinte cardiaque très modérée et à un âge tardif. Nous avons donc décidé d'utiliser le modèle DBA2mdx, une souris mdx sur un fond génétique DBA2/J qui présente une atteinte cardiaque (Fukada et al., 2010). Le fond DBA2/J porte une mutation sur le gène *LTBP4*, une protéine régulatrice de l'activité de la voie de signalisation TGF- β , mais également une mutation sur le gène *Dyscalc1*, impliqué dans le développement osseux (Aherrahrou et al., 2007). La capacité d'auto-renouvellement des cellules satellites chez les souris DBA2/J est diminuée et la sensibilité des muscles aux exercices répétés est augmentée par rapport aux autres fonds génétiques (Fukada et al., 2010).

La caractérisation du modèle DBA/2-mdx que nous avons effectuée au laboratoire est en accord avec les données de caractérisation du modèle précédentes (Coley et al., 2016; Fukada et al., 2010; van Putten et al., 2019). Nous avons observé une perte de poids chez les souris, une diminution de la force musculaire par un test d'échappement. Au niveau respiratoire, les données de pléthysmographie à 2 et 4 mois montrent une diminution des volumes d'inspiration et d'expiration, qui sont liés à l'atteinte du diaphragme précédemment observée dans le modèle. Ces données de pléthysmographie se normalisent à 6 mois, De façon intéressante, il a déjà été décrit que le phénotype du muscle squelettique pouvait se stabiliser voire diminuer avec l'âge (van Putten et al., 2019), sans que les raisons pouvant expliquer cette réversion partielle soient comprises. Concernant l'atteinte cardiaque, à l'histologie, nous observons des lésions fibrotiques surtout en périphérie du cœur et la présence de calcifications qui ont été montrées comme étant liée à la mutation sur le gène *Dyscalc1* dans ce fond génétique (Brunnert et al., 1999; Korff et al., 2006), ainsi qu'une hypertrophie du cœur. Nous n'avons pas mis en évidence de diminution de la fonction cardiaque comme décrit dans l'étude de Coley et al. où une diminution de la fraction d'éjection et de la fraction de raccourcissement avait été observé à partir de 7 mois (Coley et al., 2016). L'âge des animaux dans notre évaluation étant moins élevé, il est donc possible que l'absence de conséquence sur la fonction cardiaque puissent apparaître de façon tardive, indiquant que l'atteinte cardiaque serait progressive.

Ainsi le modèle DBA/2-mdx présente une cardiomyopathie hypertrophique, avec une diminution de la fonction cardiaque et la présence de fibrose, mais pas de dilatation du ventricule gauche contrairement à l'atteinte retrouvée chez les patients. Il n'existe pas à ce jour de modèle murin reflétant l'atteinte cardiaque retrouvée chez les patients DMD. Le meilleur modèle de la DCM retrouvée chez les patients DMD est le chien GRMD.

III. Identification des voies de signalisation impliquées dans l'atteinte cardiaque

Nous avons choisi de comparer les transcriptomes des deux modèles, DeltaMex5 et DBA/2-mdx, donc d'un modèle de cardiomyopathie dilatée et d'un modèle de cardiomyopathie hypertrophique. Les transcriptomes ont été étudiés à différents stades de la pathologie cardiaque : à un stade précoce où l'atteinte n'est pas encore installée (à 1 mois), et à un stade où la pathologie est plus installée et où l'on observe un phénotype cardiaque marqué. Pour le modèle DeltaMex5, l'âge de 4 mois a été choisi, car il présente les signes de la DCM : fibrose, dilatation ventriculaire et diminution de la fonction cardiaque. Pour le modèle DBA2mdx, l'âge de 6 mois a été choisi, car il présente les signes d'une cardiomyopathie hypertrophique : fibrose et hypertrophie cardiaque.

Discussion et Conclusion

Les résultats ont montré dans le modèle DeltaMex5, qu'à un âge précoce de la pathologie, peu de gènes sont dérégulés et de manière peu intense (moins de 50 gènes), alors qu'à un âge où la DCM est installée, le nombre de gènes dérégulés est important (2 621) et les gènes les plus dérégulés sont augmentés de façon considérable, jusqu'à un log2 FC supérieur à 6. Les gènes les plus augmentés chez DeltaMex5 sont très liés à la fibrose (Ostéopontine, *Cilp*, *Ltp2*, *Gpnm2* ...), impliqués dans la voie TGF- β (*Cilp*, *Ltp2*, *Periostine*, *Timp1* ...) et dans la voie WNT (*Spp1*, *Sfrp2*, *Dkk3* ...). Dans le modèle DBA/2-mdx, les gènes dérégulés à 1 mois sont déjà nombreux (2 186) et fortement dérégulés, jusqu'à un log2 FC supérieur à 3. A un âge où la cardiomyopathie est installée, le nombre de gènes dérégulés n'est augmenté que de 500, jusqu'à un log2 FC de 4. Cependant, seuls 706 gènes sont dérégulés en commun entre les deux stades dans ce modèle. Ainsi à l'âge précoce de la maladie, on observe que les deux modèles sont très différents, reflétant sans doute la spécificité génétique : le modèle DeltaMex5 ne présente que peu de gènes modifiés, tandis que le modèle DBA/2-mdx a déjà plus de 2000 gènes modifiés. Le nombre important de gènes dérégulés dans le cœur des souris DBA/2-mdx pourrait être dû à l'association de la mutation sur le gène de la dystrophine avec les autres mutations portées par le fond DBA/2, comme la mutation sur *LTBP4*, qui pourraient dès le départ exacerber la pathologie.

Hlf est le seul gène à être dérégulé de façon commune entre les différents âges et dans les deux modèles. En effet, le gène *Hlf* est sous-exprimé dès 1 mois, et cette sous-expression est exacerbée dans le temps. *Hlf* est un facteur de transcription de la famille bZip impliqué dans la médiation de l'expression génique et de la physiologie dans le rythme circadien. Un modèle murin KO des facteurs de transcriptions PAR bZip (*DBP*, *HLF*, et *TEF*) a été généré et présente une hypertrophie cardiaque (Wang et al., 2010a). Il serait donc intéressant d'étudier la surexpression d'*Hlf* dans une approche thérapeutique.

Les dérégulations transcriptionnelles vues dans les modèles à un stade avancé de la pathologie portent majoritairement sur les mêmes gènes et voies de signalisation bien qu'il y ait une différence de phénotype. On retrouve 1175 gènes communs aux deux modèles, dont 929 sont surexprimés. Les voies dérégulées à ce stade semblent donc une signature de la dégradation du cœur. Les voies de signalisation de l'inflammation médiées par les chimiokines et les cytokines ainsi que les voies de signalisation impliquant les intégrines sont les deux voies les plus dérégulées dans les deux modèles. Les voies TGF- β et WNT qui avaient été identifiées dans le top 5 des gènes les plus dérégulés sont retrouvées dans l'ontologie génique parmi les voies de signalisation les plus impliquées. Parmi les voies les plus diminuées, on retrouve la voie du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR γ). Toutes ces voies sont reliées entre elles et ont été précédemment impliquées dans la fibrose cardiaque, l'un des principaux phénotypes que nous avons observé dans les modèles DeltaMex5 et DBA/2-mdx. Les effecteurs de la voie TGF- β sont des cytokines et entraînent l'augmentation des

Discussion et Conclusion

intégrines dans l'inflammation et la fibrose. Il existe un circuit de transactivation TGF- β / Wnt dans les fibroblastes cardiaques entraînant l'apparition de la fibrose (Dzialo et al., 2018 758) (Seo et al., 2019 757), et à contrario, la voie PPAR γ qui prévient la fibrose est contrôlée de manière négative par la voie TGF- β renforcée par des ligands WNT (Vallee et al., 2018 749). Nous avons décidé de nous intéresser dans un premier temps aux voies de signalisation WNT et TGF- β . L'enjeu était d'identifier de potentielles modifications du transcriptome communes dans les deux modèles lorsque la pathologie est installée.

Le rôle de la voie WNT dans les cardiomyopathies dilatées d'origine génétique ou idiopathique chez l'Homme a été précédemment décrit (Abraityte et al., 2017a; Le Dour et al., 2017; Lu et al., 2016), tout comme le rôle de la voie TGF- β (Felkin et al., 2009). Cependant, leurs rôles dans DCM génétiques dues à une mutation dans la titine n'avaient pas encore été mis en lumière. L'activation de la voie WNT dans le tissu musculaire de patients DMD a été démontrée (Liu et al., 2016), ainsi que dans le système cognitif dans le modèle mdx (Fuenzalida et al., 2016), mais son activation dans le muscle cardiaque n'a pas été étudiée. La surexpression de la voie TGF- β dans le muscle est associée à la sévérité du phénotype chez les patients DMD (Song et al., 2017), et dans le cœur dans le modèle mdx (Au et al., 2011). Le modèle DBA/2-mdx présente une mutation sur le gène *Ltbp4* qui empêche la protéine de séquestrer TGF- β , ce qui entraîne une augmentation de l'inflammation musculaire (Heydemann et al., 2009). Chez les patients le polymorphisme de *LTBP4* est également associé à un phénotype plus sévère (Flanigan et al., 2013). La voie WNT a également été décrite dans d'autres cardiomyopathies, comme la cardiomyopathie arythmogénique (Lorenzon et al., 2017), tout comme la voie TGF- β dont l'expression est augmentée dans différents modèles expérimentaux d'infarctus du myocarde et d'hypertrophie cardiaque (Dobaczewski et al., 2011). Ces deux voies pourraient donc représenter des cibles pour des approches thérapeutiques génériques d'une cardiomyopathie.

Au-delà des voies de signalisation surexprimées, les voies plus diminuées dans les modèles sont la phosphorylation oxydative et la fonction mitochondriale. Ce qui est en lien avec ce que nous avons observé dans la caractérisation du modèle DeltaMex5 qui présentait en microscopie électronique un aspect anormal des mitochondries, ainsi que la présence notable de vacuoles autophagiques et non autophagiques. Cette atteinte des mitochondries avait été confirmée par une augmentation des marqueurs mitochondriaux de l'apoptose cellulaire et une dérégulation des marqueurs du transport mitochondrial. Dans les cardiomyopathies dilatées dues à une variant tronquant de la titine chez l'Homme l'altération du métabolisme mitochondrial a été retrouvée (Verdonschot et al., 2018). Ainsi il serait également intéressant d'étudier la dérégulation mitochondriale qui a lieu dans le modèle pour comprendre le rôle des mitochondries dans la pathologie.

IV. Modulation des voies de signalisation WNT et TGF- β et des gènes candidats

IV.A. L'inhibition pharmacologique des voies améliore la dilatation ventriculaire et la fonction cardiaque

La combinaison de SB431542, un inhibiteur de la voie de signalisation TGF- β (Inman et al., 2002), et de XAV939, un inhibiteur de la voie de signalisation WNT (Huang et al., 2009), a été évaluée dans notre modèle titine. Les souris traitées ont montré une amélioration du phénotype, avec un retour à la normale de la masse des souris et du cœur, du diamètre du ventricule gauche et de la fonction cardiaque. Ainsi, la dilatation du ventricule gauche et l'hypokinésie du cœur, qui sont les marqueurs primaires de la cardiomyopathie dilatée, sont traitées par l'inhibition des voies WNT et TGF- β . Cependant, la fibrose cardiaque qui signe le remodelage cardiaque n'a pas été améliorée par le traitement. Il reste à tester les différents marqueurs de l'atteinte des cardiomyocytes, pour évaluer si les cardiomyocytes sont lésés ou non, et évaluer ainsi le second paramètre du remodelage cardiaque, qui pourrait expliquer une amélioration de la fonction cardiaque. La masse des souris étant de retour à la normale, le métabolisme semble également amélioré par le traitement. Il resterait donc à évaluer la fonction mitochondriale pour voir si elle est également améliorée.

L'effet cardioprotecteur de SB431542 a précédemment été démontré dans un modèle de pathologie cardiaque induite par une infection parasitaire par *Trypanosoma cruzi* (1 injection IP de 10mg/kg, 3 jours après l'infection, évaluation après 14 jours) (Waghbi et al., 2009). L'efficacité anti-fibrotique de XAV939 a été montrée sur un modèle murin de fibrose cutanée (2,5 mg/kg en IP, 4 fois par jour pendant 2 mois) (Distler et al., 2013). Il a aussi été montré que l'association des deux inhibiteurs augmente la reprogrammation des cardiomyocytes et la maturation de ces derniers en présence de facteurs de transcription (Gata4, Mef2c et Tbx5) *in vivo* dans un modèle murin d'infarctus induit (2 semaines après l'infarctus, IP journalière de 10mg/kg de SB431542 et 2,5 mg/kg de XAV939 pendant 2 semaines) (Mohamed et al., 2017; Sadahiro and Ieda, 2020). L'étude avait montré que l'effet positif des inhibiteurs était dépendant de l'ajout des facteurs de transcription. Nos travaux montrent donc pour la première fois l'intérêt d'utiliser ces 2 inhibiteurs sur un modèle de cardiomyopathie d'origine génétique. Un protocole est également en cours pour évaluer l'effet de chaque inhibiteur individuellement sur le modèle, ainsi que l'association des deux inhibiteurs dans le modèle DBA/2-mdx. Au vu de l'implication des voies WNT et TGF- β dans les atteintes cardiaques de façon générale, il

serait intéressant de tester les inhibiteurs dans d'autres modèles de cardiomyopathie d'origine génétique ou induits pour évaluer la restauration du phénotype.

IV.B. Transfert de gène

La modulation de différents gènes appartenant aux voies WNT et TGF- β qui ont été identifiés comme particulièrement surexprimés dans les deux modèles à un stade avancé de la pathologie cardiaque a été évaluée par une surexpression ou une inhibition de ces gènes. Un problème rencontré a été le dosage des protéines faute d'anticorps permettant la différenciation des gènes murins et humains, les protéines étant souvent très proches. Une solution pourrait être de rajouter un tag sur les constructions qui permettrait de doser indirectement la protéine. Il est de plus possible qu'il existe des boucles de rétrocontrôle de la protéine sur son expression transcriptionnelle, régulant ainsi les gènes murins et humain pour empêcher la surexpression des protéines, comme suggéré par la diminution de l'ARN Cipl murin chez les souris traitées par l'AAV-CILP. Il est donc nécessaire de mieux définir les outils de mesure de la modulation des voies de signalisation afin de valider de façon définitive les vecteurs.

Hormis WISP2, qui avait été choisi car il appartenait à la voie WNT bien que moins surexprimé que les autres gènes, toutes les approches de transfert de gène montrent un effet positif sur au moins un des critères que nous avons évalués. L'effet est principalement observé sur la fibrose, avec une diminution du tissu fibrotique et des marqueurs transcriptionnels de la fibrose, mais aussi avec une diminution de l'hypertrophie cardiaque et de la masse des souris. L'approche WISP2 montre tout de même une diminution de *TGF- β 1* et de *Col1a1* qui corrèle avec le rôle antifibrotique de WISP2 en ciblant la voie TGF- β (Yoon et al., 2010). Cependant, aucune des approches ne permet la diminution de la dilatation ventriculaire ni une amélioration de la fonction cardiaque mesurés en échographie. Cet effet est en accord avec les résultats des marqueurs transcriptionnels : seuls les marqueurs de la fibrose et de l'inflammation sont améliorés, tandis que les marqueurs de l'atteinte des cardiomyocytes ne sont pas changés. L'action préférentielle des candidats sur la diminution de la fibrose est cohérente avec le fait que les candidats ont tous été décrits comme impliqués dans la fibrose cardiaque.

D'autres études sont parues au cours de ma thèse, ciblant ces mêmes gènes dans les cardiopathies. Ainsi en 2018, l'équipe de Zhang et al. a étudié la modulation de CILP dans un modèle murin d'insuffisance cardiaque induite par chirurgie (Zhang et al., 2018). Ils ont montré que la surexpression de CILP diminuait la fibrose cardiaque en se liant à TGF- β 1. Les souris ont reçu une dose de 5×10^{11} vg, ce qui est plus de deux fois supérieur à la dose que nous avons injecté, et les études ont été faites après 53 jours d'expression, contre 3 mois dans notre cas. Très récemment en 2020, l'équipe

de Pang et al. a utilisé un siRNA pour diminuer l'expression de LTBP2 dans un modèle de rat DCM induit par doxorubicine, leur permettant d'obtenir une réversion du phénotype dans une cardiomyopathie dilatée (Pang et al., 2020). De même en 2016, l'équipe de Jeong et al. a montré qu'une surexpression de WISP2/CCN5 dans un modèle d'insuffisance cardiaque induit, permettait la réversion de la fibrose (Jeong et al., 2016), avec une dose de vecteur de 5×10^{10} vg, avec une étude après 2 mois d'expression. DKK3 a également été étudié par l'équipe de Zhai et al. en 2018, la surexpression de DKK3 par un adénovirus dans un modèle de fibrose induite par l'angiotensine améliore également la fibrose cardiaque (Zhai et al., 2018). Les modèles utilisés pour ces diverses études sont tous des modèles de cardiopathie induits, contrairement au modèle DeltaMex5 qui est génétique, mais ils montrent la même amélioration de la fibrose, qui n'est pas systématiquement liée à une amélioration de la fonction cardiaque, corrélant avec nos résultats. Ces approches qui ciblent la fibrose seraient applicables dans différents modèles car la fibrose cardiaque n'est pas spécifique de la cardiomyopathie dilatée.

La variabilité entre les souris est également un facteur à prendre en compte dans l'évaluation de l'effet thérapeutique. En effet pour tous les vecteurs, la souris ayant le plus de transgène est la souris qui montre le plus d'amélioration des marqueurs. Le nombre de souris réduit ne permet pas de lisser cette variabilité. Il serait nécessaire d'effectuer les expériences sur un nombre de souris plus grand. Compte tenu des résultats et des études parues entre temps, nous sommes actuellement en train d'évaluer si l'injection d'une quantité supérieure de vecteur et avec un temps d'expression plus court permettrait d'obtenir des résultats plus significatifs. En effet, la durée d'expression que nous avons choisie pour notre vecteur est de 3 mois, mais il est possible que du fait de la dégradation des cardiomyocytes le vecteur ne s'exprime plus que partiellement, diminuant donc son efficacité et rendant le dosage compliqué. Une meilleure compréhension des voies de signalisation et des régulations qui peuvent avoir lieu permettrait éventuellement de concevoir des vecteurs avec des séquences modifiées, pour exprimer directement les formes matures, par exemple.

La surexpression du facteur de transcription Nrf2 est l'approche qui a donné les meilleurs résultats en terme de diminution de la fibrose. Cependant, comme les autres approches de transfert de gène évaluée, la restauration de la fonction cardiaque n'a pas été atteinte. Une étude plus complète de cette approche reste nécessaire, notamment pour évaluer l'amélioration du remodelage cardiaque au niveau des cardiomyocytes. Les différents miRs étudiés n'ont pas montré de modification des principaux paramètres. Ils avaient pourtant été choisis en fonction de leur potentiel rôle cardioprotecteur. Les tissus cardiaques de souris injectées par les miR sont particulièrement fibrotiques. Les analyses n'ont pas été poursuivies plus en avant, mais il serait nécessaire d'étudier une

potentielle surcharge de la voie de signalisation prenant en charge les miR qui expliquerait le manque d'efficacité des vecteurs.

V. Conclusion générale

La présente étude a permis la caractérisation du modèle DeltaMex5 comme un modèle de cardiomyopathie dilatée avec une diminution de la fonction systolique et une importante dilatation du ventricule gauche associées à la mise en place d'un important tissu fibrotique. Le modèle DBA/2-mdx est quant à lui un modèle de cardiomyopathie hypertrophique. L'analyse des transcriptomes cardiaques des deux modèles a permis de définir des perturbations moléculaires communes impliquées dans l'insuffisance cardiaque qui pourraient être ciblées par des approches thérapeutiques, en particulier les voies de signalisation WNT et TGF- β . A partir de ces analyses, la modulation sur le modèle DeltaMex5 des cascades moléculaires identifiées a permis de mettre en évidence des candidats pertinents pour le traitement des cardiomyopathies avec des effets complémentaires. L'approche qui semble la plus intéressante serait l'utilisation concomitante du vecteur AAV9-NRF2 ou du vecteur AAV9-CILP combinée à un traitement par les inhibiteurs pharmacologiques des voies WNT et TGF- β . Cette thérapie combinée permettrait de traiter la fibrose avec NRF2/CILP et d'améliorer la fonction cardiaque avec les inhibiteurs pharmacologiques. Les approches vont également être évaluées sur le modèle DBA/2-mdx, qui bien que ne présentant pas de dilatation cardiaque présente une forte fibrose, la cible principale de nos approches de transfert de gène.

ANNEXES

Annexe 1 : Top 40 des gènes dérégulés dans le cœur des souris DeltaMex5 à 1 mois.

Souligné = spécifique du modèle

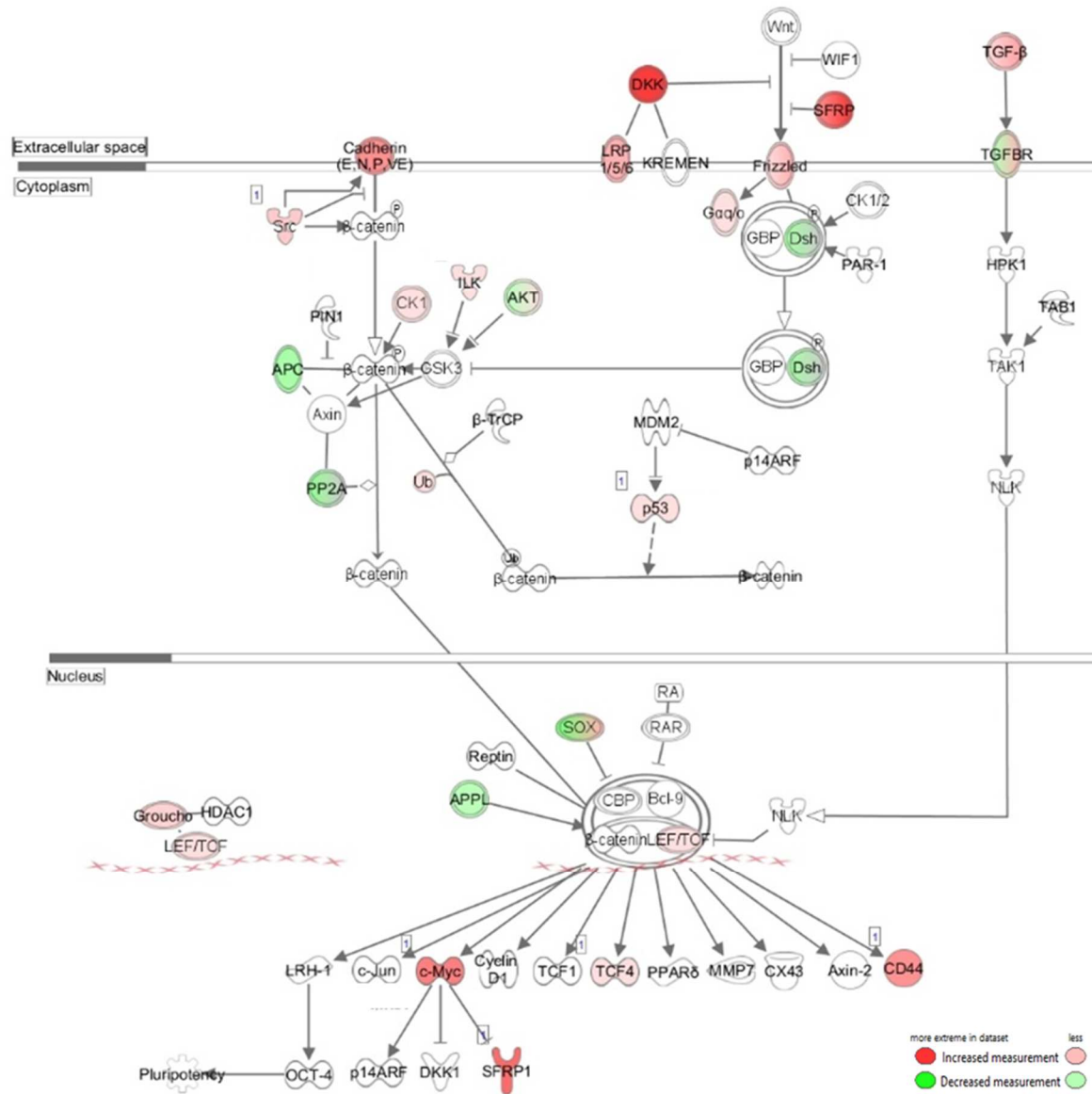
Gene	log2FC	padj	Moyenne DeltaMex5	Moyenne C57bl6
<i>H2-Ab1</i>	0,99	1,18E-07	214,29	65,91
<i>Lrrc4b</i>	0,98	6,63E-12	554,64	238,98
<i>H2-Aa</i>	0,96	3,91E-07	301,91	91,71
<i>Myl1</i>	0,89	1,48E-08	600,12	270,85
<i>Npas2</i>	0,76	2,85E-05	238,76	112,32
<i>Acta2</i>	-0,76	4,26E-07	2005,51	3864,01
<i>Ifi205</i>	0,76	2,96E-04	142,09	56,07
<i>Cd74</i>	0,73	3,12E-05	680,64	345,99
<i>Per2</i>	-0,72	9,41E-04	124,21	309,85
<i>Pop4</i>	-0,72	8,50E-04	65,28	151,40
<i>Lrat</i>	-0,72	1,32E-03	55,14	154,60
<i>Mroh6</i>	0,67	4,25E-03	109,32	41,45
<i>Prnd</i>	-0,66	4,25E-03	134,48	293,01
<i>H2-Eb1</i>	0,66	5,46E-03	230,78	94,70
<i>Gabrg3</i>	0,66	9,00E-04	44,44	6,99
<i>Tspan4</i>	-0,64	4,31E-04	169,05	302,73
<i>Pnpla3</i>	0,64	6,36E-03	190,31	90,70
<i>Gm27646</i>	-0,62	4,36E-03	163,28	309,30
<i>Nt5e</i>	0,62	1,64E-03	952,71	535,45
<i>Myot</i>	0,62	1,26E-02	232,56	105,78
<i>Kit</i>	-0,61	3,16E-03	163,72	296,81
<i>Hist1h3c</i>	-0,61	1,60E-02	43,04	106,61
<i>Slc26a10</i>	-0,60	1,20E-03	292,28	502,02
<i>Tnfrsf12a</i>	0,60	1,56E-02	407,03	200,69
<i>Thrsp</i>	0,59	1,21E-02	198,35	106,30
<i>Hist1h1a</i>	-0,59	2,17E-02	39,11	104,88
<i>Cdc25b</i>	-0,58	2,73E-02	48,39	106,82
<i>mt-Ti</i>	0,58	1,85E-04	2535,19	1568,44
<i>Gm17224</i>	0,57	3,19E-02	200,11	88,25
<i>ENSMUSG00000084994</i>	0,57	3,76E-02	106,13	47,05
<i>Slit2</i>	-0,56	1,25E-02	195,33	336,68
<i>Gm44637</i>	-0,55	8,90E-03	249,86	414,66
<i>Ppp1r3c</i>	0,55	6,18E-03	2360,21	1446,18
<i>Per3</i>	-0,54	2,51E-02	279,20	998,71
<i>Hcn2</i>	-0,54	3,16E-03	251,23	400,87
<i>Hlf</i>	-0,53	5,67E-03	305,76	489,36
<i>Hsph1</i>	0,53	1,51E-02	969,89	590,21
<i>Smc2</i>	-0,53	2,11E-02	125,44	208,70
<i>Osbpl6</i>	-0,52	1,21E-02	186,34	296,77
<i>Klhl33</i>	-0,52	4,19E-02	130,76	219,54

Annexe 2 : Top 50 de gènes dérégulés dans le cœur des souris DBA/2-mdx à 1 mois.

Souligné = spécifique du modèle

Gene	log2FC	padj	Moyenne DBA/2- mdx	Moyenne DBA/2
<i>Saa3</i>	3,38	4,37E-20	97,21	1,97
<i>Fam46b</i>	3,08	4,41E-27	545,38	42,80
<i>Ano5</i>	-2,69	1,43E-11	3,75	86,90
<i>Ptx3</i>	2,51	1,03E-10	137,14	9,56
<i>Acsf6</i>	-2,39	7,69E-19	50,01	334,68
<i>Csf2rb2</i>	2,35	7,58E-14	252,48	34,85
<u><i>Inmt</i></u>	-2,33	1,21E-10	8,52	79,10
<u><i>Prune2</i></u>	-2,31	4,00E-32	725,29	4059,47
<i>Il1rn</i>	2,20	1,02E-07	93,40	7,75
<i>Gm12224</i>	-2,20	1,04E-09	10,79	82,40
<u><i>Cdh4</i></u>	-2,20	1,67E-11	12,22	80,66
<u><i>Gck</i></u>	-2,17	2,99E-17	54,99	301,07
<u><i>Aqp8</i></u>	-2,17	5,60E-07	1,01	32,13
<i>Selp</i>	2,13	2,58E-07	64,20	6,08
<i>Socs3</i>	2,12	8,19E-17	399,31	76,27
<i>Timp1</i>	2,08	1,34E-07	268,91	33,53
<i>Cacna1s</i>	-2,07	3,85E-13	49,62	259,51
<i>Chil1</i>	2,06	4,97E-08	83,52	11,84
<u><i>Fbxo44</i></u>	-2,03	1,99E-06	8,54	91,16
<u><i>Gm43146</i></u>	-1,97	1,66E-07	20,01	129,52
<i>Scn4b</i>	-1,96	1,43E-11	308,40	1507,46
<i>Acsm5</i>	-1,95	1,53E-09	36,37	188,52
<i>Ccl2</i>	1,89	3,01E-12	179,72	40,24
<i>Fat2</i>	-1,89	2,20E-06	17,65	113,96
<u><i>Tchhl1</i></u>	-1,87	3,52E-05	1,89	29,51
<i>Ccl7</i>	1,86	3,62E-10	106,37	23,62
<u><i>Mal</i></u>	-1,85	1,14E-13	52,58	220,10
<i>Armc2</i>	-1,84	2,10E-10	249,28	1100,02
<i>Gm37759</i>	-1,83	6,52E-07	13,63	71,97
<i>Csf2rb</i>	1,82	1,70E-06	305,21	56,58
<i>Matn4</i>	1,82	5,93E-05	117,92	9,38
<u><i>Bdh1</i></u>	-1,80	2,85E-07	391,89	1895,83
<u><i>Gm15743</i></u>	-1,79	1,61E-06	47,41	239,19
<i>Pdgfrr1</i>	1,77	6,47E-05	214,92	27,27
<i>Dhrs9</i>	1,73	1,28E-04	81,28	8,87
<u><i>Pah</i></u>	-1,72	1,58E-04	2,78	30,23
<i>Adam8</i>	1,71	2,92E-06	149,68	32,50
<i>Fgr</i>	1,71	7,67E-05	56,42	8,76
<i>Gpr39</i>	1,70	6,26E-05	77,95	13,17
<i>Pik3r5</i>	1,70	1,80E-05	161,63	32,41
<i>Ptpv</i>	1,69	2,04E-04	154,89	16,32
<u><i>Vwc2</i></u>	1,69	2,12E-05	70,83	14,15
<i>Slfn4</i>	1,66	1,59E-04	80,68	12,25
<u><i>Ric3</i></u>	-1,66	4,75E-06	24,21	104,56
<i>Ptgds</i>	-1,65	4,05E-10	686,40	2486,74
<i>Itih4</i>	1,65	1,23E-04	136,65	24,08
<i>Gm43921</i>	1,64	2,12E-04	185,69	28,79
<i>Tmprss4</i>	-1,64	3,55E-04	2,40	30,01
<i>Hs3st5</i>	-1,64	1,06E-06	31,60	123,79
<i>Gm42609</i>	1,63	9,61E-05	52,65	10,04

Annexe 3 : Les gènes de la voie canonique WNT dans le cœur du modèle DeltaMex5 à 4 mois.
 Ingenuity Pathway Analysis.



© 2000-2020 QIAGEN. All rights reserved.

BIBLIOGRAPHIE

- Abraityte, A., Lunde, I.G., Askevold, E.T., Michelsen, A.E., Christensen, G., Aukrust, P., Yndestad, A., Fiane, A., Andreassen, A., Aakhus, S., *et al.* (2017a). Wnt5a is associated with right ventricular dysfunction and adverse outcome in dilated cardiomyopathy. *Scientific Reports* 7, 3490.
- Abraityte, A., Vinge, L.E., Askevold, E.T., Lekva, T., Michelsen, A.E., Ranheim, T., Alfsnes, K., Fiane, A., Aakhus, S., Lunde, I.G., *et al.* (2017b). Wnt5a is elevated in heart failure and affects cardiac fibroblast function. *J Mol Med (Berl)* 95, 767-777.
- Adami, E. (2017) (Max Delbrück Center for Molecular Medicine).
- Aherrahrou, Z., Doehring, L.C., Kaczmarek, P.M., Liptau, H., Ehlers, E.M., Pomarino, A., Wrobel, S., Gotz, A., Mayer, B., Erdmann, J., *et al.* (2007). Ultrafine mapping of Dyscalc1 to an 80-kb chromosomal segment on chromosome 7 in mice susceptible for dystrophic calcification. *Physiol Genomics* 28, 203-212.
- Amoasii, L., Hildyard, J.C.W., Li, H., Sanchez-Ortiz, E., Mireault, A., Caballero, D., Harron, R., Stathopoulou, T.R., Massey, C., Shelton, J.M., *et al.* (2018). Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Science* 362, 86-91.
- Amodeo, P., Castiglione Morelli, M.A., Strazzullo, G., Fucile, P., Gautel, M., and Motta, A. (2001). Kinase recognition by calmodulin: modeling the interaction with the autoinhibitory region of human cardiac titin kinase. *J Mol Biol* 306, 81-95.
- Au, C.G., Butler, T.L., Sherwood, M.C., Egan, J.R., North, K.N., and Winlaw, D.S. (2011). Increased connective tissue growth factor associated with cardiac fibrosis in the mdx mouse model of dystrophic cardiomyopathy. *Int J Exp Pathol* 92, 57-65.
- Bai, Y., Zhang, P., Zhang, X., Huang, J., Hu, S., and Wei, Y. (2012). LTBP-2 acts as a novel marker in human heart failure - a preliminary study. *Biomarkers* 17, 407-415.
- Baird, L., and Dinkova-Kostova, A.T. (2011). The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol* 85, 241-272.
- Bang, M.-L., Centner, T., Fornoff, F., Geach, A.J., Gotthardt, M., McNabb, M., Witt, C.C., Labeit, D., Gregorio, C.C., Granzier, H., *et al.* (2001). The Complete Gene Sequence of Titin, Expression of an Unusual 700-kDa Titin Isoform, and Its Interaction With Obscurin Identify a Novel Z-Line to I-Band Linking System. *Circulation Research* 89, 1065-1072.
- Bao, M.-W., Cai, Z., Zhang, X.-J., Li, L., Liu, X., Wan, N., Hu, G., Wan, F., Zhang, R., Zhu, X., *et al.* (2015). Dickkopf-3 protects against cardiac dysfunction and ventricular remodelling following myocardial infarction. *Basic Research in Cardiology* 110, 25.
- Bass-Stringer, S., Bernardo, B.C., May, C.N., Thomas, C.J., Weeks, K.L., and McMullen, J.R. (2018). Adeno-Associated Virus Gene Therapy: Translational Progress and Future Prospects in the Treatment of Heart Failure. *Heart, Lung and Circulation* 27, 1285-1300.
- Bathgate, R.A., Leggabe, E.D., McGuane, J.T., Su, Y., Pham, T., Ferraro, T., Layfield, S., Hannan, R.D., Thomas, W.G., Samuel, C.S., *et al.* (2008). Adenovirus-mediated delivery of relaxin reverses cardiac fibrosis. *Molecular and cellular endocrinology* 280, 30-38.
- Belanto, J.J., Mader, T.L., Eckhoff, M.D., Strandjord, D.M., Banks, G.B., Gardner, M.K., Lowe, D.A., and Ervasti, J.M. (2014). Microtubule binding distinguishes dystrophin from utrophin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 5723-5728.
- Bellinger, A.M., Reiken, S., Carlson, C., Mongillo, M., Liu, X., Rothman, L., Matecki, S., Lacampagne, A., and Marks, A.R. (2009). Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat Med* 15, 325-330.
- Bengtsson, N.E., Hall, J.K., Odom, G.L., Phelps, M.P., Andrus, C.R., Hawkins, R.D., Hauschka, S.D., Chamberlain, J.R., and Chamberlain, J.S. (2017). Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun* 8, 14454.

Benson, M.A., Tinsley, C.L., Waite, A.J., Carlisle, F.A., Sweet, S.M.M., Ehler, E., George, C.H., Lai, F.A., Martin-Rendon, E., and Blake, D.J. (2017). Ryanodine receptors are part of the myospryn complex in cardiac muscle. *Sci Rep* 7, 017-06395.

Bera, A., and Sen, D. (2017). Promise of adeno-associated virus as a gene therapy vector for cardiovascular diseases. *Heart Fail Rev* 22, 795-823.

Bergmann, O., Bhardwaj, R.D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabe-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B.A., Druid, H., *et al.* (2009). Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324, 98-102.

Bernardo, B.C., Weeks, K.L., Pongsukwechkul, T., Gao, X., Kiriazis, H., Cemerlang, N., Boey, E.J.H., Tham, Y.K., Johnson, C.J., Qian, H., *et al.* (2018). Gene delivery of medium chain acyl-coenzyme A dehydrogenase induces physiological cardiac hypertrophy and protects against pathological remodelling. *Clin Sci* 132, 381-397.

Besler, C., Urban, D., Watzka, S., Lang, D., Rommel, K.-P., Kandolf, R., Klingel, K., Thiele, H., Linke, A., Schuler, G., *et al.* (2016). Endomyocardial miR-133a levels correlate with myocardial inflammation, improved left ventricular function, and clinical outcome in patients with inflammatory cardiomyopathy. *European journal of heart failure* 18, 1442-1451.

Bhat, H.F., Mir, S.S., Dar, K.B., Bhat, Z.F., Shah, R.A., and Ganai, N.A. (2018). ABC of multifaceted dystrophin glycoprotein complex (DGC). *Journal of Cellular Physiology* 233, 5142-5159.

Bia, B.L., Cassidy, P.J., Young, M.E., Rafael, J.A., Leighton, B., Davies, K.E., Radda, G.K., and Clarke, K. (1999). Decreased myocardial nNOS, increased iNOS and abnormal ECGs in mouse models of Duchenne muscular dystrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology* 31, 1857-1862.

Bironaite, D., Daunoravicius, D., Bogomolovas, J., Cibiras, S., Vitkus, D., Zurauskas, E., Zasytyte, I., Rucinskas, K., Labeit, S., Venalis, A., *et al.* (2015). Molecular mechanisms behind progressing chronic inflammatory dilated cardiomyopathy. *BMC Cardiovascular Disorders* 15, 26.

Bishop, J.E., Greenbaum, R., Gibson, D.G., Yacoub, M., and Laurent, G.J. (1990). Enhanced deposition of predominantly type I collagen in myocardial disease. *Journal of molecular and cellular cardiology* 22, 1157-1165.

Blain, A.M., Grealley, E., McClorey, G., Manzano, R., Betts, C.A., Godfrey, C., O'Donovan, L., Coursindel, T., Gait, M.J., Wood, M.J., *et al.* (2018). Peptide-conjugated phosphodiesterase oligomer-mediated exon skipping has benefits for cardiac function in mdx and Cmah^{-/-}mdx mouse models of Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 13.

Blyszczuk, P., Muller-Edenborn, B., Valenta, T., Osto, E., Stellato, M., Behnke, S., Glatz, K., Basler, K., Luscher, T.F., Distler, O., *et al.* (2017). Transforming growth factor-beta-dependent Wnt secretion controls myofibroblast formation and myocardial fibrosis progression in experimental autoimmune myocarditis. *European heart journal* 38, 1413-1425.

Bostick, B., Yue, Y., and Duan, D. (2010). Gender influences cardiac function in the mdx model of Duchenne cardiomyopathy. *Muscle Nerve* 42, 600-603.

Brunnert, S.R., Shi, S., and Chang, B. (1999). Chromosomal localization of the loci responsible for dystrophic cardiac calcinosis in DBA/2 mice. *Genomics* 59, 105-107.

Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A., and Moore, K.J. (1984). X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 1189-1192.

Bullard, B., Ferguson, C., Minajeva, A., Leake, M.C., Gautel, M., Labeit, D., Ding, L., Labeit, S., Horwitz, J., Leonard, K.R., *et al.* (2004). Association of the chaperone alphaB-crystallin with titin in heart muscle. *J Biol Chem* 279, 7917-7924.

Burke, M.A., Chang, S., Wakimoto, H., Gorham, J.M., Conner, D.A., Christodoulou, D.C., Parfenov, M.G., DePalma, S.R., Eminaga, S., Konno, T., *et al.* (2016a). Molecular profiling of dilated cardiomyopathy that progresses to heart failure. *JCI Insight* 1.

Burke, M.A., Cook, S.A., Seidman, J.G., and Seidman, C.E. (2016b). Clinical and Mechanistic Insights Into the Genetics of Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 68, 2871-2886.

Cadot, B., and Gomes, E.R. (2016). Skeletal Muscle. In *Encyclopedia of Cell Biology*, R.A. Bradshaw, and P.D. Stahl, eds. (Waltham: Academic Press), pp. 677-682.

Cai, S.A., Hou, N., Zhao, G.J., Liu, X.W., He, Y.Y., Liu, H.L., Hua, Y.Q., Li, L.R., Huang, Y., Ou, C.W., *et al.* (2018). Nrf2 Is a Key Regulator on Puerarin Preventing Cardiac Fibrosis and Upregulating Metabolic Enzymes UGT1A1 in Rats. *Frontiers in pharmacology* 9.

- Cardiogen (2018). Consensus d'experts sur les maladies cardiaques héréditaires : Prise en charge de la Cardiomyopathie Dilatée.
- Carè, A., Catalucci, D., Felicetti, F., Bonci, D., Addario, A., Gallo, P., Bang, M.-L., Segnalini, P., Gu, Y., Dalton, N.D., *et al.* (2007). MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nature Medicine* *13*, 613-618.
- Carlsson, E., and Thornell, L.E. (1987). Diversification of the myofibrillar M-band in rat skeletal muscle during postnatal development. *Cell Tissue Res* *248*, 169-180.
- Carmignac, V., Salih, M.A., Quijano-Roy, S., Marchand, S., Al Rayess, M.M., Mukhtar, M.M., Urtizberea, J.A., Labeit, S., Guicheney, P., Leturcq, F., *et al.* (2007). C-terminal titin deletions cause a novel early-onset myopathy with fatal cardiomyopathy. *Ann Neurol* *61*, 340-351.
- Carnicer, R., Suffredini, S., Liu, X., Reilly, S., Simon, J.N., Surdo, N.C., Zhang, Y.H., Lygate, C.A., Channon, K.M., and Casadei, B. (2017). The Subcellular Localisation of Neuronal Nitric Oxide Synthase Determines the Downstream Effects of NO on Myocardial Function. *Cardiovasc Res* *113*, 321-331.
- Carter, B.J. (2000). Adeno-associated viruses as gene transfer vehicles. *Contributions to microbiology* *4*, 85-106.
- Carter, P.J., and Samulski, R.J. (2000). Adeno-associated viral vectors as gene delivery vehicles. *International journal of molecular medicine* *6*, 17-27.
- Carthy, J.M., Garmaroudi, F.S., Luo, Z., and McManus, B.M. (2011). Wnt3a induces myofibroblast differentiation by upregulating TGF-beta signaling through SMAD2 in a beta-catenin-dependent manner. *PLoS One* *6*, e19809.
- Centner, T., Yano, J., Kimura, E., McElhinny, A.S., Pelin, K., Witt, C.C., Bang, M.L., Trombitas, K., Granzier, H., Gregorio, C.C., *et al.* (2001). Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J Mol Biol* *306*, 717-726.
- Ceyhan-Birsoy, O., Agrawal, P.B., Hidalgo, C., Schmitz-Abe, K., DeChene, E.T., Swanson, L.C., Soemedi, R., Vasli, N., Iannaccone, S.T., Shieh, P.B., *et al.* (2013). Recessive truncating titin gene, TTN, mutations presenting as centronuclear myopathy. *Neurology* *81*, 1205-1214.
- Charton, K., Sarparanta, J., Vihola, A., Milic, A., Jonson, P.H., Suel, L., Luque, H., Boumela, I., Richard, I., and Udd, B. (2015). CAPN3-mediated processing of C-terminal titin replaced by pathological cleavage in titinopathy. *Human molecular genetics* *24*, 3718-3731.
- Charton, K., Suel, L., Henriques, S.F., Moussu, J.P., Bovolenta, M., Taillepierre, M., Becker, C., Lipson, K., and Richard, I. (2016). Exploiting the CRISPR/Cas9 system to study alternative splicing in vivo: application to titin. *Human molecular genetics* *25*, 4518-4532.
- Chauveau, C., Rowell, J., and Ferreira, A. (2014). A Rising Titan: TTN Review and Mutation Update. *Human Mutation* *35*, 1046-1059.
- Chen, R.-R., Fan, X.-H., Chen, G., Zeng, G.-W., Xue, Y.-G., Liu, X.-T., and Wang, C.-Y. (2019). Irisin attenuates angiotensin II-induced cardiac fibrosis via Nrf2 mediated inhibition of ROS/ TGFβ1/Smad2/3 signaling axis. *Chemico-Biological Interactions* *302*, 11-21.
- Choi, S.H., Weng, L.C., Roselli, C., Lin, H., Haggerty, C.M., Shoemaker, M.B., Barnard, J., Arking, D.E., Chasman, D.I., Albert, C.M., *et al.* (2018). Association Between Titin Loss-of-Function Variants and Early-Onset Atrial Fibrillation. *Jama* *320*, 2354-2364.
- Claycomb, W.C., Lanson, N.A., Jr., Stallworth, B.S., Egeland, D.B., Delcarpio, J.B., Bahinski, A., and Izzo, N.J., Jr. (1998). HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 2979-2984.
- Coley, W.D., Bogdanik, L., Vila, M.C., Yu, Q., Van Der Meulen, J.H., Rayavarapu, S., Novak, J.S., Nearing, M., Quinn, J.L., Saunders, A., *et al.* (2016). Effect of genetic background on the dystrophic phenotype in mdx mice. *Human molecular genetics* *25*, 130-145.
- Collier, P., Watson, C.J., van Es, M.H., Phelan, D., McCorrigan, C., Tolan, M., Ledwidge, M.T., McDonald, K.M., and Baugh, J.A. (2012). Getting to the heart of cardiac remodeling; how collagen subtypes may contribute to phenotype. *Journal of molecular and cellular cardiology* *52*, 148-153.
- Constantin, B. (2014). Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins. *Biochim Biophys Acta* *2*, 635-642.
- Cotton, S., Voudouris, N.J., and Greenwood, K.M. (2001). Intelligence and Duchenne muscular dystrophy: full-scale, verbal, and performance intelligence quotients. *Dev Med Child Neurol* *43*, 497-501.
- Creemers, E.E., and van Rooij, E. (2016). Function and Therapeutic Potential of Noncoding RNAs in Cardiac Fibrosis. *Circ Res* *118*, 108-118.

- Davies, K.E., and Nowak, K.J. (2006). Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 762-773.
- Deo, R.C. (2016). Alternative Splicing, Internal Promoter, Nonsense-Mediated Decay, or All Three: Explaining the Distribution of Truncation Variants in Titin. *Circ Cardiovasc Genet* 9, 419-425.
- Ding, W., Zhang, L., Yan, Z., and Engelhardt, J.F. (2005). Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene therapy* 12, 873-880.
- Distler, A., Deloch, L., Huang, J., Dees, C., Lin, N.Y., Palumbo-Zerr, K., Beyer, C., Weidemann, A., Distler, O., Schett, G., *et al.* (2013). Inactivation of tankyrases reduces experimental fibrosis by inhibiting canonical Wnt signalling. *Annals of the rheumatic diseases* 72, 1575-1580.
- Dobaczewski, M., Chen, W., and Frangogiannis, N.G. (2011). Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling. *Journal of molecular and cellular cardiology* 51, 600-606.
- Doorenweerd, N., Mahfouz, A., van Putten, M., Kaliyaperumal, R., PAC, T.H., Hendriksen, J.G.M., Aartsma-Rus, A.M., Verschuuren, J., Niks, E.H., Reinders, M.J.T., *et al.* (2017). Timing and localization of human dystrophin isoform expression provide insights into the cognitive phenotype of Duchenne muscular dystrophy. *Sci Rep* 7, 017-12981.
- Duan, J., Gherghe, C., Liu, D., Hamlett, E., Srikantha, L., Rodgers, L., Regan, J.N., Rojas, M., Willis, M., Leask, A., *et al.* (2012). Wnt1/betacatenin injury response activates the epicardium and cardiac fibroblasts to promote cardiac repair. *The EMBO journal* 31, 429-442.
- Duboc, D., Meune, C., Lerebours, G., Devaux, J.Y., Vaksman, G., and Becane, H.M. (2005). Effect of perindopril on the onset and progression of left ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of the American College of Cardiology* 45, 855-857.
- Duguez, S., Bartoli, M., and Richard, I. (2006). Calpain 3: a key regulator of the sarcomere? *Febs J* 273, 3427-3436.
- Dzialo, E., Tkacz, K., and Blyszczuk, P. (2018). Crosstalk between the TGF-beta and WNT signalling pathways during cardiac fibrogenesis. *Acta Biochim Pol* 65, 341-349.
- Ehmsen, J., Poon, E., and Davies, K. (2002). The dystrophin-associated protein complex. *Journal of cell science* 115, 2801-2803.
- El Refaey, M., Xu, L., Gao, Y., Canan, B.D., Adesanya, T.M.A., Warner, S.C., Akagi, K., Symer, D.E., Mohler, P.J., Ma, J., *et al.* (2017). In Vivo Genome Editing Restores Dystrophin Expression and Cardiac Function in Dystrophic Mice. *Circ Res* 121, 923-929.
- Elliott, P., Andersson, B., Arbustini, E., Bilinska, Z., Cecchi, F., Charron, P., Dubourg, O., Kuhl, U., Maisch, B., McKenna, W.J., *et al.* (2008). Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *European heart journal* 29, 270-276.
- Emery, A.E. (1991). Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscular disorders : NMD* 1, 19-29.
- Engel, J., and Furthmayr, H. (1987). Electron microscopy and other physical methods for the characterization of extracellular matrix components: laminin, fibronectin, collagen IV, collagen VI, and proteoglycans. *Methods in enzymology* 145, 3-78.
- Ergul, Y., Ekici, B., Nisli, K., Tatli, B., Binboga, F., Acar, G., Ozmen, M., and Omeroglu, R.E. (2012). Evaluation of the North Star Ambulatory Assessment scale and cardiac abnormalities in ambulant boys with Duchenne muscular dystrophy. *J Paediatr Child Health* 48, 610-616.
- Eschenhagen, T., Bolli, R., Braun, T., Field, L.J., Fleischmann, B.K., Frisé, J., Giacca, M., Hare, J.M., Houser, S., Lee, R.T., *et al.* (2017). Cardiomyocyte Regeneration: A Consensus Statement. *Circulation* 136, 680-686.
- Eulalio, A., Mano, M., Ferro, M.D., Zentilin, L., Sinagra, G., Zacchigna, S., and Giacca, M. (2012). Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature* 492, 376-381.
- Evila, A., Palmio, J., Vihola, A., Savarese, M., Tasca, G., Penttila, S., Lehtinen, S., Jonson, P.H., De Bleecker, J., Rainer, P., *et al.* (2017). Targeted Next-Generation Sequencing Reveals Novel TTN Mutations Causing Recessive Distal Titinopathy. *Molecular neurobiology* 54, 7212-7223.
- Evilä, A., Vihola, A., Sarparanta, J., Raheem, O., Palmio, J., Sandell, S., Eymard, B., Illa, I., Rojas-Garcia, R., Hankiewicz, K., *et al.* (2014). Atypical phenotypes in titinopathies explained by second titin mutations. *Ann Neurol* 75, 230-240.
- Felkin, L.E., Lara-Pezzi, E., George, R., Yacoub, M.H., Birks, E.J., and Barton, P.J.R. (2009). Expression of Extracellular Matrix Genes During Myocardial Recovery From Heart Failure After Left Ventricular Assist Device Support. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 28, 117-122.

Ferrarini, M., Arsic, N., Recchia, F.A., Zentilin, L., Zacchigna, S., Xu, X., Linke, A., Giacca, M., and Hintze, T.H. (2006). Adeno-Associated Virus-Mediated Transduction of VEGF165 Improves Cardiac Tissue Viability and Functional Recovery After Permanent Coronary Occlusion in Conscious Dogs. *Circulation Research* 98, 954-961.

Finsterer, J., and Stöllberger, C. (2003). The Heart in Human Dystrophinopathies. *Cardiology* 99, 1-19.

Fish, K.M., Ladage, D., Kawase, Y., Karakikes, I., Jeong, D., Ly, H., Ishikawa, K., Hadri, L., Tilemann, L., Muller-Ehmsen, J., *et al.* (2013). AAV9.I-1c Delivered via Direct Coronary Infusion in a Porcine Model of Heart Failure Improves Contractility and Mitigates Adverse Remodeling. *Circulation: Heart Failure* 6, 310-317.

Flanigan, K.M., Ceco, E., Lamar, K.M., Kaminoh, Y., Dunn, D.M., Mendell, J.R., King, W.M., Pestronk, A., Florence, J.M., Mathews, K.D., *et al.* (2013). LTBP4 genotype predicts age of ambulatory loss in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 73, 481-488.

Fougerousse, F., Durand, M., Suel, L., Pourquié, O., Delezoide, A.-L., Romero, N.B., Abitbol, M., and Beckmann, J.S. (1998). Expression of Genes (CAPN3, SGCA, SGCB, and TTN) Involved in Progressive Muscular Dystrophies during Early Human Development. *Genomics* 48, 145-156.

Frangogiannis, N.G. (2017). The role of transforming growth factor (TGF)-beta in the infarcted myocardium. *Journal of thoracic disease* 9, S52-S63.

Frangogiannis, N.G. (2019). Cardiac fibrosis: Cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities. *Molecular aspects of medicine* 65, 70-99.

Frey, N., McKinsey, T.A., and Olson, E.N. (2000). Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat Med* 6, 1221-1227.

Fuenzalida, M., Espinoza, C., Pérez, M.Á., Tapia-Rojas, C., Cuitino, L., Brandan, E., and Inestrosa, N.C. (2016). Wnt signaling pathway improves central inhibitory synaptic transmission in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Neurobiology of Disease* 86, 109-120.

Fukada, S., Morikawa, D., Yamamoto, Y., Yoshida, T., Sumie, N., Yamaguchi, M., Ito, T., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., Tsujikawa, K., *et al.* (2010). Genetic background affects properties of satellite cells and mdx phenotypes. *Am J Pathol* 176, 2414-2424.

Fukuda, N., Granzier, H.L., Ishiwata, S., and Kurihara, S. (2008). Physiological functions of the giant elastic protein titin in mammalian striated muscle. *J Physiol Sci* 58, 151-159.

Fukuzawa, A., Lange, S., Holt, M., Vihola, A., Carmignac, V., Ferreira, A., Udd, B., and Gautel, M. (2008). Interactions with titin and myomesin target obscurin and obscurin-like 1 to the M-band: implications for hereditary myopathies. *Journal of cell science* 121, 1841-1851.

Gabrielsen, A., Lawler, P.R., Yongzhong, W., Steinbrüchel, D., Blagoja, D., Paulsson-Berne, G., Kastrup, J., and Hansson, G.K. (2007). Gene expression signals involved in ischemic injury, extracellular matrix composition and fibrosis defined by global mRNA profiling of the human left ventricular myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology* 42, 870-883.

Gao, Q.Q., and McNally, E.M. (2015). The Dystrophin Complex: Structure, Function, and Implications for Therapy. *Compr Physiol* 5, 1223-1239.

Garvey, S.M., Rajan, C., Lerner, A.P., Frankel, W.N., and Cox, G.A. (2002). The muscular dystrophy with myositis (mdm) mouse mutation disrupts a skeletal muscle-specific domain of titin. *Genomics* 79, 146-149.

Gaudesius, G., Miragoli, M., Thomas, S.P., and Rohr, S. (2003). Coupling of cardiac electrical activity over extended distances by fibroblasts of cardiac origin. *Circ Res* 93, 421-428.

Ge, G., and Greenspan, D.S. (2006). BMP1 controls TGFbeta1 activation via cleavage of latent TGFbeta-binding protein. *The Journal of Cell Biology* 175, 111-120.

Gerull, B. (2015). The Rapidly Evolving Role of Titin in Cardiac Physiology and Cardiomyopathy. *The Canadian journal of cardiology* 31, 1351-1359.

Gessert, S., and Köhl, M. (2010). The Multiple Phases and Faces of Wnt Signaling During Cardiac Differentiation and Development. *Circulation Research* 107, 186-199.

Gill, C., Mestril, R., and Samali, A. (2002). Losing heart: the role of apoptosis in heart disease--a novel therapeutic target? *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16, 135-146.

Gotthardt, M., Hammer, R.E., Hübner, N., Monti, J., Witt, C.C., McNabb, M., Richardson, J.A., Granzier, H., Labeit, S., and Herz, J. (2003). Conditional Expression of Mutant M-line Titins Results in Cardiomyopathy with Altered Sarcomere Structure. *Journal of Biological Chemistry* 278, 6059-6065.

- Gramlich, M., Michely, B., Krohne, C., Heuser, A., Erdmann, B., Klaassen, S., Hudson, B., Magarin, M., Kirchner, F., Todiras, M., *et al.* (2009). Stress-induced dilated cardiomyopathy in a knock-in mouse model mimicking human titin-based disease. *Journal of molecular and cellular cardiology* *47*, 352-358.
- Gramlich, M., Pane, L.S., Zhou, Q., Chen, Z., Murgia, M., Schötterl, S., Goedel, A., Metzger, K., Brade, T., Parrotta, E., *et al.* (2015). Antisense-mediated exon skipping: a therapeutic strategy for titin-based dilated cardiomyopathy. *EMBO Mol Med* *7*, 562-576.
- Granzier, H.L., and Labeit, S. (2004). The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res* *94*, 284-295.
- Granzier, H.L., Radke, M.H., Peng, J., Westermann, D., Nelson, O.L., Rost, K., King, N.M., Yu, Q., Tschöpe, C., McNabb, M., *et al.* (2009). Truncation of titin's elastic PEVK region leads to cardiomyopathy with diastolic dysfunction. *Circ Res* *105*, 557-564.
- Greenberg, B., Butler, J., Felker, G.M., Ponikowski, P., Voors, A.A., Desai, A.S., Barnard, D., Bouchard, A., Jaski, B., Lyon, A.R., *et al.* (2016). Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet* *387*, 1178-1186.
- Gregorio, C.C., Trombitas, K., Centner, T., Kolmerer, B., Stier, G., Kunke, K., Suzuki, K., Obermayr, F., Herrmann, B., Granzier, H., *et al.* (1998). The NH2 terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with a novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity. *J Cell Biol* *143*, 1013-1027.
- Grosche, J., Meissner, J., and Eble, J.A. (2018). More than a syllable in fib-ROS-is: The role of ROS on the fibrotic extracellular matrix and on cellular contacts. *Molecular aspects of medicine* *63*, 30-46.
- Hackman, P., Marchand, S., Sarparanta, J., Vihola, A., Pénisson-Besnier, I., Eymard, B., Pardal-Fernández, J.M., Hammouda, E.-H., Richard, I., Illa, I., *et al.* (2008). Truncating mutations in C-terminal titin may cause more severe tibial muscular dystrophy (TMD). *Neuromuscular Disorders* *18*, 922-928.
- Hackman, P., Savarese, M., Carmignac, V., Udd, B., and Salih, M.A. (2012). Salih Myopathy.
- Hahn, J.K., Neupane, B., Pradhan, K., Zhou, Q., Testa, L., Pelzl, L., Maleck, C., Gawaz, M., and Gramlich, M. (2019). The assembly and evaluation of antisense oligonucleotides applied in exon skipping for titin-based mutations in dilated cardiomyopathy. *Journal of molecular and cellular cardiology* *131*, 12-19.
- Hajjar, R.J., Zsebo, K., Deckelbaum, L., Thompson, C., Rudy, J., Yaroshinsky, A., Ly, H., Kawase, Y., Wagner, K., Borow, K., *et al.* (2008). Design of a Phase 1/2 Trial of Intracoronary Administration of AAV1/SERCA2a in Patients With Heart Failure. *Journal of Cardiac Failure* *14*, 355-367.
- Hakim, C.H., Wasala, N.B., Nelson, C.E., Wasala, L.P., Yue, Y., Louderman, J.A., Lessa, T.B., Dai, A., Zhang, K., Jenkins, G.J., *et al.* (2018). AAV CRISPR editing rescues cardiac and muscle function for 18 months in dystrophic mice. *JCI Insight* *3*, 124297.
- Hanna, A., and Frangogiannis, N.G. (2019). The Role of the TGF- β Superfamily in Myocardial Infarction. *Front Cardiovasc Med* *6*.
- Harris, E., Topf, A., Vihola, A., Evila, A., Barresi, R., Hudson, J., Hackman, P., Herron, B., MacArthur, D., Lochmuller, H., *et al.* (2017). A 'second truncation' in TTN causes early onset recessive muscular dystrophy. *Neuromuscular disorders : NMD* *27*, 1009-1017.
- Harvey, P.A., and Leinwand, L.A. (2011). Cellular mechanisms of cardiomyopathy. *The Journal of Cell Biology* *194*, 355-365.
- He, W., Zhang, L., Ni, A., Zhang, Z., Mirotsoy, M., Mao, L., Pratt, R.E., and Dzau, V.J. (2010). Exogenously administered secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) reduces fibrosis and improves cardiac function in a rat model of myocardial infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 21110-21115.
- Hein, S., Arnon, E., Kostin, S., Schonburg, M., Elsasser, A., Polyakova, V., Bauer, E.P., Klovekorn, W.P., and Schaper, J. (2003). Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation* *107*, 984-991.
- Heineke, J., and Molkentin, J.D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* *7*, 589-600.

Hendriksen, J.G., and Vles, J.S. (2008). Neuropsychiatric disorders in males with duchenne muscular dystrophy: frequency rate of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorder, and obsessive--compulsive disorder. *J Child Neurol* 23, 477-481.

Herman, D.S., Lam, L., Taylor, M.R., Wang, L., Teekakirikul, P., Christodoulou, D., Conner, L., DePalma, S.R., McDonough, B., Sparks, E., *et al.* (2012). Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 366, 619-628.

Hermans, K.C., Daskalopoulos, E.P., and Blankesteyn, W.M. (2012). Interventions in Wnt signaling as a novel therapeutic approach to improve myocardial infarct healing. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5, 1755-1536.

Herron, T.J., and McDonald, K.S. (2002). Small amounts of alpha-myosin heavy chain isoform expression significantly increase power output of rat cardiac myocyte fragments. *Circ Res* 90, 1150-1152.

Heydemann, A., Ceco, E., Lim, J.E., Hadhazy, M., Ryder, P., Moran, J.L., Beier, D.R., Palmer, A.A., and McNally, E.M. (2009). Latent TGF-beta-binding protein 4 modifies muscular dystrophy in mice. *The Journal of clinical investigation* 119, 3703-3712.

Hinkel, R., Lange, P., Petersen, B., Gottlieb, E., Ng, J.K.M., Finger, S., Horstkotte, J., Lee, S., Thormann, M., Knorr, M., *et al.* (2015). Heme Oxygenase-1 Gene Therapy Provides Cardioprotection Via Control of Post-Ischemic Inflammation: An Experimental Study in a Pre-Clinical Pig Model. *Journal of the American College of Cardiology* 66, 154-165.

Hinz, B. (2007). Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *The Journal of investigative dermatology* 127, 526-537.

Hoshijima, M., Ikeda, Y., Iwanaga, Y., Minamisawa, S., Date, M.O., Gu, Y., Iwatate, M., Li, M., Wang, L., Wilson, J.M., *et al.* (2002). Chronic suppression of heart-failure progression by a pseudophosphorylated mutant of phospholamban via in vivo cardiac rAAV gene delivery. *Nat Med* 8, 864-871.

Huang, L., Yu, H., Fan, X., Li, X., Mao, L., Cheng, J., Zeng, X., and Dang, X. (2017). A Potential Role of Esophageal Cancer Related Gene-4 for Atrial Fibrillation. *Scientific Reports* 7, 2717.

Huang, S.M., Mishina, Y.M., Liu, S., Cheung, A., Stegmeier, F., Michaud, G.A., Charlat, O., Wiелlette, E., Zhang, Y., Wiessner, S., *et al.* (2009). Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* 461, 614-620.

Huang, Y., Xia, J., Zheng, J., Geng, B., Liu, P., Yu, F., Liu, B., Zhang, H., Xu, M., Ye, P., *et al.* (2013). Deficiency of cartilage oligomeric matrix protein causes dilated cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 108, 013-0374.

Huebsch, K.A., Kudryashova, E., Wooley, C.M., Sher, R.B., Seburn, K.L., Spencer, M.J., and Cox, G.A. (2005). Mdm muscular dystrophy: interactions with calpain 3 and a novel functional role for titin's N2A domain. *Human molecular genetics* 14, 2801-2811.

Hughes, D.C., Wallace, M.A., and Baar, K. (2015). Effects of aging, exercise, and disease on force transfer in skeletal muscle. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 309, E1-E10.

Huttner Inken, G., Wang Louis, W., Santiago Celine, F., Horvat, C., Johnson, R., Cheng, D., von Frieling-Salewsky, M., Hillcoat, K., Bemand Timothy, J., Trivedi, G., *et al.* (2018). A-Band Titin Truncation in Zebrafish Causes Dilated Cardiomyopathy and Hemodynamic Stress Intolerance. *Circulation: Genomic and Precision Medicine* 11, e002135.

Ingwall, J.S. (2009). Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovasc Res* 81, 412-419.

Ingwall, J.S., and Weiss, R.G. (2004). Is the Failing Heart Energy Starved? *Circulation Research* 95, 135-145.

Inman, G.J., Nicolás, F.J., Callahan, J.F., Harling, J.D., Gaster, L.M., Reith, A.D., Laping, N.J., and Hill, C.S. (2002). SB-431542 Is a Potent and Specific Inhibitor of Transforming Growth Factor- β Superfamily Type I Activin Receptor-Like Kinase (ALK) Receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Molecular pharmacology* 62, 65-74.

Ishikawa, K., Fish, K.M., Tilemann, L., Rapti, K., Agüero, J., Santos-Gallego, C.G., Lee, A., Karakikes, I., Xie, C., Akar, F.G., *et al.* (2014). Cardiac I-1c Overexpression With Reengineered AAV Improves Cardiac Function in Swine Ischemic Heart Failure. *Molecular Therapy* 22, 2038-2045.

Ivey, M.J., and Tallquist, M.D. (2016). Defining the Cardiac Fibroblast. *Circ J* 80, 2269-2276.

Izarra, A., Moscoso, I., Levent, E., Cañón, S., Cerrada, I., Díez-Juan, A., Blanca, V., Núñez-Gil, I.-J., Valiente, I., Ruíz-Sauri, A., *et al.* (2014). miR-133a Enhances the Protective Capacity of Cardiac Progenitors Cells after Myocardial Infarction. *Stem Cell Reports* 3, 1029-1042.

Izumi, R., Niihori, T., Aoki, Y., Suzuki, N., Kato, M., Warita, H., Takahashi, T., Tateyama, M., Nagashima, T., Funayama, R., *et al.* (2013). Exome sequencing identifies a novel TTN mutation in a family with hereditary myopathy with early respiratory failure. *J Hum Genet* 58, 259-266.

Janghra, N., Morgan, J.E., Sewry, C.A., Wilson, F.X., Davies, K.E., Muntoni, F., and Tinsley, J. (2016). Correlation of Utrophin Levels with the Dystrophin Protein Complex and Muscle Fibre Regeneration in Duchenne and Becker Muscular Dystrophy Muscle Biopsies. *PLoS One* 11.

Japp, A.G., Gulati, A., Cook, S.A., Cowie, M.R., and Prasad, S.K. (2016). The Diagnosis and Evaluation of Dilated Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 67, 2996-3010.

Jarve, A., Muhlstedt, S., Qadri, F., Nickl, B., Schulz, H., Hubner, N., Ozcelik, C., and Bader, M. (2017). Adverse left ventricular remodeling by glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B in myocardial infarction. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 31, 556-568.

Jaski, B.E., Jessup, M.L., Mancini, D.M., Cappola, T.P., Pauly, D.F., Greenberg, B., Borow, K., Dittrich, H., Zsebo, K.M., and Hajjar, R.J. (2009). Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID Trial), a First-in-Human Phase 1/2 Clinical Trial. *Journal of Cardiac Failure* 15, 171-181.

Jeong, D., Lee, M.-A., Li, Y., Yang, D.K., Kho, C., Oh, J.G., Hong, G., Lee, A., Song, M.H., LaRocca, T.J., *et al.* (2016). Matricellular Protein CCN5 Reverses Established Cardiac Fibrosis. *Journal of the American College of Cardiology* 67, 1556-1568.

Jessup, M., Greenberg, B., Mancini, D., Cappola, T., Pauly, D.F., Jaski, B., Yaroshinsky, A., Zsebo, K.M., Dittrich, H., and Hajjar, R.J. (2011). Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation* 124, 304-313.

Jiang, X., Liu, Y., Liu, X., Wang, W., Wang, Z., Hu, Y., Zhang, Y., Jose, P.A., Wei, Q., and Yang, Z. (2018). Over-expression of a cardiac-specific human dopamine D5 receptor mutation in mice causes a dilated cardiomyopathy through ROS over-generation by NADPH oxidase activation and Nrf2 degradation. *Redox Biol* 19, 134-146.

Johnson, E.K., Zhang, L., Adams, M.E., Phillips, A., Freitas, M.A., Froehner, S.C., Green-Church, K.B., and Montanaro, F. (2012). Proteomic analysis reveals new cardiac-specific dystrophin-associated proteins. *PLoS One* 7.

Ju, H., Zhao, S., Jassal, D.S., and Dixon, I.M. (1997). Effect of AT1 receptor blockade on cardiac collagen remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 35, 223-232.

Jung, C., Martins, A.S., Niggli, E., and Shirokova, N. (2008). Dystrophic cardiomyopathy: amplification of cellular damage by Ca²⁺ signalling and reactive oxygen species-generating pathways. *Cardiovasc Res* 77, 766-773.

Kamdar, F., and Garry, D.J. (2016). Dystrophin-Deficient Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 67, 2533-2546.

Kang, C., Badr, M.A., Kyrychenko, V., Eskelinen, E.L., and Shirokova, N. (2018). Deficit in PINK1/PARKIN-mediated mitochondrial autophagy at late stages of dystrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 114, 90-102.

Kanısıcak, O., Khalil, H., Ivey, M.J., Karch, J., Maliken, B.D., Correll, R.N., Brody, M.J., SC, J.L., Aronow, B.J., Tallquist, M.D., *et al.* (2016). Genetic lineage tracing defines myofibroblast origin and function in the injured heart. *Nat Commun* 7, 12260.

Kapelko, V.I. (2001). Extracellular matrix alterations in cardiomyopathy: The possible crucial role in the dilative form. *Exp Clin Cardiol* 6, 41-49.

Kaprielian, R.R., Stevenson, S., Rothery, S.M., Cullen, M.J., and Severs, N.J. (2000). Distinct patterns of dystrophin organization in myocyte sarcolemma and transverse tubules of normal and diseased human myocardium. *Circulation* 101, 2586-2594.

Kaspar, R.W., Allen, H.D., Ray, W.C., Alvarez, C.E., Kissel, J.T., Pestronk, A., Weiss, R.B., Flanigan, K.M., Mendell, J.R., and Montanaro, F. (2009). Analysis of dystrophin deletion mutations predicts age of cardiomyopathy onset in becker muscular dystrophy. *Circ Cardiovasc Genet* 2, 544-551.

Kawada, T., Sakamoto, A., Nakazawa, M., Urabe, M., Masuda, F., Hemmi, C., Wang, Y., Shin, W.S., Nakatsuru, Y., Sato, H., *et al.* (2001). Morphological and physiological restorations of hereditary

form of dilated cardiomyopathy by somatic gene therapy. *Biochemical and biophysical research communications* 284, 431-435.

Kellermayer, D., Smith, J.E., 3rd, and Granzier, H. (2019). Titin mutations and muscle disease. *Pflugers Arch* 471, 673-682.

Kinbara, K., Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1997). Muscle-specific calpain, p94, interacts with the extreme C-terminal region of connectin, a unique region flanked by two immunoglobulin C2 motifs. *Archives of biochemistry and biophysics* 342, 99-107.

Klietsch, R., Ervasti, J.M., Arnold, W., Campbell, K.P., and Jorgensen, A.O. (1993). Dystrophin-glycoprotein complex and laminin colocalize to the sarcolemma and transverse tubules of cardiac muscle. *Circ Res* 72, 349-360.

Knezevic, T., Myers, V.D., Su, F., Wang, J., Song, J., Zhang, X.Q., Gao, E., Gao, G., Muniswamy, M., Gupta, M.K., *et al.* (2016). Adeno-associated Virus Serotype 9 - Driven Expression of BAG3 Improves Left Ventricular Function in Murine Hearts with Left Ventricular Dysfunction Secondary to a Myocardial Infarction. *JACC Basic Transl Sci* 1, 647-656.

Knoll, R., Hoshijima, M., Hoffman, H.M., Person, V., Lorenzen-Schmidt, I., Bang, M.L., Hayashi, T., Shiga, N., Yasukawa, H., Schaper, W., *et al.* (2002). The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell* 111, 943-955.

Kobayashi, K., Luo, M., Zhang, Y., Wilkes, D.C., Ge, G., Grieskamp, T., Yamada, C., Liu, T.-C., Huang, G., Basson, C.T., *et al.* (2009). Secreted Frizzled-related protein 2 is a procollagen C proteinase enhancer with a role in fibrosis associated with myocardial infarction. *Nature Cell Biology* 11, 46-55.

Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C., and Kunkel, L.M. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50, 509-517.

Kong, P., Shinde, A.V., Su, Y., Russo, I., Chen, B., Saxena, A., Conway, S.J., Graff, J.M., and Frangogiannis, N.G. (2018). Opposing Actions of Fibroblast and Cardiomyocyte Smad3 Signaling in the Infarcted Myocardium. *Circulation* 137, 707-724.

Kontrogianni-Konstantopoulos, A., Ackermann, M.A., Bowman, A.L., Yap, S.V., and Bloch, R.J. (2009). Muscle giants: molecular scaffolds in sarcomerogenesis. *Physiol Rev* 89, 1217-1267.

Kontrogianni-Konstantopoulos, A., and Bloch, R.J. (2003). The Hydrophilic Domain of Small Ankyrin-1 Interacts with the Two N-terminal Immunoglobulin Domains of Titin. *Journal of Biological Chemistry* 278, 3985-3991.

Korff, S., Schoensiegel, F., Riechert, N., Weichenhan, D., Katus, H.A., and Ivandic, B.T. (2006). Fine mapping of Dyscalc1, the major genetic determinant of dystrophic cardiac calcification in mice. *Physiological Genomics* 25, 387-392.

Kornegay, J.N. (2017). The golden retriever model of Duchenne muscular dystrophy. *Skelet Muscle* 7, 017-0124.

Kornegay, J.N., Tuler, S.M., Miller, D.M., and Levesque, D.C. (1988). Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs. *Muscle & Nerve* 11, 1056-1064.

Krenz, M., and Robbins, J. (2004). Impact of beta-myosin heavy chain expression on cardiac function during stress. *Journal of the American College of Cardiology* 44, 2390-2397.

Kulkarni, A.A., Thatcher, T.H., Olsen, K.C., Maggirwar, S.B., Phipps, R.P., and Sime, P.J. (2011). PPAR-gamma ligands repress TGFbeta-induced myofibroblast differentiation by targeting the PI3K/Akt pathway: implications for therapy of fibrosis. *PLoS One* 6, 0015909.

Labeit, S., Gautel, M., Lakey, A., and Trinick, J. (1992). Towards a molecular understanding of titin. *The EMBO journal* 11, 1711-1716.

Labeit, S., Lahmers, S., Burkart, C., Fong, C., McNabb, M., Witt, S., Witt, C., Labeit, D., and Granzier, H. (2006). Expression of distinct classes of titin isoforms in striated and smooth muscles by alternative splicing, and their conserved interaction with filamins. *J Mol Biol* 362, 664-681.

Lange, S., Auerbach, D., McLoughlin, P., Perriard, E., Schafer, B.W., Perriard, J.C., and Ehler, E. (2002). Subcellular targeting of metabolic enzymes to titin in heart muscle may be mediated by DRAL/FHL-2. *Journal of cell science* 115, 4925-4936.

Lange, S., Ouyang, K., Meyer, G., Cui, L., Cheng, H., Lieber, R.L., and Chen, J. (2009). Obscurin determines the architecture of the longitudinal sarcoplasmic reticulum. *Journal of cell science* 122, 2640-2650.

Lange, S., Xiang, F., Yakovenko, A., Vihola, A., Hackman, P., Rostkova, E., Kristensen, J., Brandmeier, B., Franzen, G., Hedberg, B., *et al.* (2005). The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science* *308*, 1599-1603.

Le Dour, C., Macquart, C., Sera, F., Homma, S., Bonne, G., Morrow, J.P., Worman, H.J., and Muchir, A. (2017). Decreased WNT/ β -catenin signalling contributes to the pathogenesis of dilated cardiomyopathy caused by mutations in the lamin a/C gene. *Human molecular genetics* *26*, 333-343.

Le Rumeur, E. (2015). Dystrophin and the two related genetic diseases, Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Bosn J Basic Med Sci* *15*, 14-20.

Lee, C. (2017). Collaborative Power of Nrf2 and PPAR γ Activators against Metabolic and Drug-Induced Oxidative Injury. *Oxid Med Cell Longev* *1378175*, 27.

Letavernier, E., Zafrani, L., Perez, J., Letavernier, B., Haymann, J.P., and Baud, L. (2012). The role of calpains in myocardial remodelling and heart failure. *Cardiovasc Res* *96*, 38-45.

LeWinter, M.M., and Granzier, H.L. (2013). Titin is a major human disease gene. *Circulation* *127*, 938-944.

Li, Y.Y., McTiernan, C.F., and Feldman, A.M. (2000). Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res* *46*, 214-224.

Lijnen, P., and Petrov, V. (2000). Induction of cardiac fibrosis by aldosterone. *Journal of molecular and cellular cardiology* *32*, 865-879.

Lin, H., Angeli, M., Chung, K.J., Ejimadu, C., Rosa, A.R., and Lee, T. (2016). sFRP2 activates Wnt/ β -catenin signaling in cardiac fibroblasts: differential roles in cell growth, energy metabolism, and extracellular matrix remodeling. *American journal of physiology Cell physiology* *311*, C710-C719.

Linke, W., and Hamdani, N. (2014). Gigantic Business Titin Properties and Function Through Thick and Thin, Vol 114.

Liu, F., Liang, Z., Xu, J., Li, W., Zhao, D., Zhao, Y., and Yan, C. (2016). Activation of the wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Polymyositis, Dermatomyositis and Duchenne Muscular Dystrophy. *J Clin Neurol* *12*, 351-360.

Liu, S., Ke, W., Liu, Y., Zhao, Z., An, L., You, X., Yang, F., Yang, X., Wang, G., and Zhao, X. (2019). Function analysis of differentially expressed microRNAs in TGF- β 1-induced cardiac fibroblasts differentiation. *Biosci Rep* *39*.

Lorenzon, A., Calore, M., Poloni, G., De Windt, L.J., Braghetta, P., and Rampazzo, A. (2017). Wnt/ β -catenin pathway in arrhythmogenic cardiomyopathy. *Oncotarget* *8*, 60640-60655.

Louis Jeune, V., Joergensen, J.A., Hajjar, R.J., and Weber, T. (2013). Pre-existing anti-adenovirus-associated virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy. *Hum Gene Ther Methods* *24*, 59-67.

Lowe, D.G. (2004). Distinctive Image Features from Scale-Invariant Keypoints. *International Journal of Computer Vision* *60*, 91-110.

Lu, D., Bao, D., Dong, W., Liu, N., Zhang, X., Gao, S., Ge, W., Gao, X., and Zhang, L. (2016). Dkk3 prevents familial dilated cardiomyopathy development through Wnt pathway. *Laboratory Investigation* *96*, 239-248.

Lynch, J.M., Maillet, M., Vanhoutte, D., Schloemer, A., Sargent, M.A., Blair, N.S., Lynch, K.A., Okada, T., Aronow, B.J., Osinska, H., *et al.* (2012). A thrombospondin-dependent pathway for a protective ER stress response. *Cell* *149*, 1257-1268.

Ma, Z.-G., Yuan, Y.-P., Zhang, X., Xu, S.-C., Wang, S.-S., and Tang, Q.-Z. (2017). Piperine Attenuates Pathological Cardiac Fibrosis Via PPAR- γ /AKT Pathways. *EBioMedicine* *18*, 179-187.

Ma, Z.G., Yuan, Y.P., Wu, H.M., Zhang, X., and Tang, Q.Z. (2018). Cardiac fibrosis: new insights into the pathogenesis. *International journal of biological sciences* *14*, 1645-1657.

Magri, F., Govoni, A., D'Angelo, M.G., Del Bo, R., Ghezzi, S., Sandra, G., Turconi, A.C., Sciacco, M., Ciscato, P., Bordoni, A., *et al.* (2011). Genotype and phenotype characterization in a large dystrophinopathic cohort with extended follow-up. *Journal of neurology* *258*, 1610-1623.

Marchand, A., Atassi, F., Gaaya, A., Leprince, P., Le Feuvre, C., Soubrier, F., Lompre, A.M., and Nadaud, S. (2011). The Wnt/beta-catenin pathway is activated during advanced arterial aging in humans. *Aging Cell* *10*, 220-232.

Marieb, E.N. (1999). *Anatomie et Physiologie Humaines* (DeBoeck Université).

Marston, S., Montgiraud, C., Munster, A.B., Copeland, O., Choi, O., Dos Remedios, C., Messer, A.E., Ehler, E., and Knöll, R. (2015). OBSCN Mutations Associated with Dilated Cardiomyopathy and Haploinsufficiency. *PLoS One* *10*.

- Martini, S.V., Rocco, P.R., and Morales, M.M. (2011). Adeno-associated virus for cystic fibrosis gene therapy. *Braz J Med Biol Res* 44, 1097-1104.
- Mastri, M., Shah, Z., Hsieh, K., Wang, X., Wooldridge, B., Martin, S., Suzuki, G., and Lee, T. (2014). Secreted Frizzled-related protein 2 as a target in antifibrotic therapeutic intervention. *American journal of physiology Cell physiology* 306, C531-C539.
- McGreevy, J.W., Hakim, C.H., McIntosh, M.A., and Duan, D. (2015). Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis Model Mech* 8, 195-213.
- McKinley, M.P., Dean O'Loughlin, V., and Stouter Bidle, T. (2014). Anatomie et physiologie : une approche intégrée (Maloine).
- Merlo, M., Pivetta, A., Pinamonti, B., Stolfo, D., Zecchin, M., Barbati, G., Di Lenarda, A., and Sinagra, G. (2014). Long-term prognostic impact of therapeutic strategies in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: changing mortality over the last 30 years. *European journal of heart failure* 16, 317-324.
- Meurs, K.M., Friedenber, S.G., Kolb, J., Saripalli, C., Tonino, P., Woodruff, K., Olby, N.J., Keene, B.W., Adin, D.B., Yost, O.L., *et al.* (2019). A missense variant in the titin gene in Doberman pinscher dogs with familial dilated cardiomyopathy and sudden cardiac death. *Human genetics* 138, 515-524.
- Mewton, N., Liu, C.Y., Croisille, P., Bluemke, D., and Lima, J.A. (2011). Assessment of myocardial fibrosis with cardiovascular magnetic resonance. *Journal of the American College of Cardiology* 57, 891-903.
- Meyers, T.A., and Townsend, D. (2019). Cardiac Pathophysiology and the Future of Cardiac Therapies in Duchenne Muscular Dystrophy. *International journal of molecular sciences* 20.
- Miyazaki, Y., Ikeda, Y., Shiraishi, K., Fujimoto, S.N., Aoyama, H., Yoshimura, K., Inui, M., Hoshijima, M., Kasahara, H., Aoki, H., *et al.* (2012). Heart failure-inducible gene therapy targeting protein phosphatase 1 prevents progressive left ventricular remodeling. *PLoS One* 7, 27.
- Mohamed, T.M., Stone, N.R., Berry, E.C., Radzinsky, E., Huang, Y., Pratt, K., Ang, Y.S., Yu, P., Wang, H., Tang, S., *et al.* (2017). Chemical Enhancement of In Vitro and In Vivo Direct Cardiac Reprogramming. *Circulation* 135, 978-995.
- Molkentin, J.D., Bugg, D., Ghearing, N., Dorn, L.E., Kim, P., Sargent, M.A., Gunaje, J., Otsu, K., and Davis, J. (2017). Fibroblast-Specific Genetic Manipulation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase In Vivo Reveals Its Central Regulatory Role in Fibrosis. *Circulation* 136, 549-561.
- Monaco, A.P., Neve, R.L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C.J., Kurnit, D.M., and Kunkel, L.M. (1986). Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 323, 646-650.
- Mori, M., Nakajima, M., Mikami, Y., Seki, S., Takigawa, M., Kubo, T., and Ikegawa, S. (2006). Transcriptional regulation of the cartilage intermediate layer protein (CILP) gene. *Biochemical and biophysical research communications* 341, 121-127.
- Muntoni, F., Torelli, S., and Ferlini, A. (2003). Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* 2, 731-740.
- Nagueh, S.F., Shah, G., Wu, Y., Torre-Amione, G., King, N.M., Lahmers, S., Witt, C.C., Becker, K., Labeit, S., and Granzier, H.L. (2004). Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 110, 155-162.
- Nakamura, A. (2015). X-Linked Dilated Cardiomyopathy: A Cardiospecific Phenotype of Dystrophinopathy. *Pharmaceuticals* 8, 303-320.
- Nakao, K., Minobe, W., Roden, R., Bristow, M.R., and Leinwand, L.A. (1997). Myosin heavy chain gene expression in human heart failure. *The Journal of clinical investigation* 100, 2362-2370.
- Nastase, L., Desikan, M., Price, S., Crummy, F., Kahn, J., and Quinlivan, R. (2017). P.10 - Analysis of mortality in a cohort of adult Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders* 27, S101.
- Neglia, D., De Caterina, A., Marraccini, P., Natali, A., Ciardetti, M., Vecoli, C., Gastaldelli, A., Ciociaro, D., Pellegrini, P., Testa, R., *et al.* (2007). Impaired myocardial metabolic reserve and substrate selection flexibility during stress in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 293, H3270-3278.
- Neubauer, S., Horn, M., Cramer, M., Harre, K., Newell, J.B., Peters, W., Pabst, T., Ertl, G., Hahn, D., Ingwall, J.S., *et al.* (1997). Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 96, 2190-2196.

- Noh, H., Yu, M.R., Kim, H.J., Lee, J.H., Park, B.W., Wu, I.H., Matsumoto, M., and King, G.L. (2017). Beta 2-adrenergic receptor agonists are novel regulators of macrophage activation in diabetic renal and cardiovascular complications. *Kidney international* 92, 101-113.
- Nuamnaichati, N., Sato, V.H., Moongkarndi, P., Parichatanond, W., and Mangmool, S. (2018). Sustained β -AR stimulation induces synthesis and secretion of growth factors in cardiac myocytes that affect on cardiac fibroblast activation. *Life Sciences* 193, 257-269.
- Nusayr, E., Strom, J., Slater, R.E., and Granzier, H.L. (2018). A Novel Mouse Model for Titin-Based Dilated Cardiomyopathy. *Biophysical journal* 114, 312a-313a.
- Oates, E.C., Jones, K.J., Donkervoort, S., Charlton, A., Brammah, S., Smith, J.E., 3rd, Ware, J.S., Yau, K.S., Swanson, L.C., Whiffin, N., *et al.* (2018). Congenital Titinopathy: Comprehensive characterization and pathogenic insights. *Ann Neurol* 83, 1105-1124.
- Okada, H., Kawaguchi, H., Kudo, T., Sawa, H., Okamoto, H., Watanabe, S., Urasawa, K., Murakami, T., and Kitabatake, A. (1996). Alteration of extracellular matrix in dilated cardiomyopathic hamster heart. *Molecular and cellular biochemistry* 156, 9-15.
- Otsu, N. (1979). A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* 9, 62-66.
- Pan, Z., Sun, X., Shan, H., Wang, N., Wang, J., Ren, J., Feng, S., Xie, L., Lu, C., Yuan, Y., *et al.* (2012). MicroRNA-101 Inhibited Postinfarct Cardiac Fibrosis and Improved Left Ventricular Compliance via the FBJ Osteosarcoma Oncogene/Transforming Growth Factor- β 2;1 Pathway. *Circulation* 126, 840-850.
- Pang, X.-F., Lin, X., Du, J.-J., and Zeng, D.-Y. (2020). LTBP2 knockdown by siRNA reverses myocardial oxidative stress injury, fibrosis and remodelling during dilated cardiomyopathy. *Acta Physiol (Oxf)* 228, e13377-e13377.
- Park, S., Ranjbarvaziri, S., Lay, F.D., Zhao, P., Miller, M.J., Dhaliwal, J.S., Huertas-Vazquez, A., Wu, X., Qiao, R., Soffer, J.M., *et al.* (2018). Genetic Regulation of Fibroblast Activation and Proliferation in Cardiac Fibrosis. *Circulation* 138, 1224-1235.
- Pauschinger, M., Knopf, D., Petschauer, S., Doerner, A., Poller, W., Schwimmbeck, P.L., Kuhl, U., and Schultheiss, H.P. (1999). Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation* 99, 2750-2756.
- Pearson Education, I. (2011).
- Peled, Y., Gramlich, M., Yoskovitz, G., Feinberg, M.S., Afek, A., Polak-Charcon, S., Pras, E., Sela, B.-A., Konen, E., Weissbrod, O., *et al.* (2014). Titin Mutation in Familial Restrictive Cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology* 171, 24-30.
- Pepe, M., Mamdani, M., Zentilin, L., Csiszar, A., Qanud, K., Zacchigna, S., Ungvari, Z., Puligadda, U., Moimas, S., Xu, X., *et al.* (2010). Intramyocardial VEGF-B167 gene delivery delays the progression towards congestive failure in dogs with pacing-induced dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 106, 1893-1903.
- Piccoli, M.T., Bar, C., and Thum, T. (2016). Non-coding RNAs as modulators of the cardiac fibroblast phenotype. *Journal of molecular and cellular cardiology* 92, 75-81.
- Pinto, A.R., Ilinykh, A., Ivey, M.J., Kuwabara, J.T., D'Antoni, M.L., Debuque, R., Chandran, A., Wang, L., Arora, K., Rosenthal, N.A., *et al.* (2016). Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circulation Research* 118, 400-409.
- Pleger, S.T., Shan, C., Ksienzyk, J., Bekerredjian, R., Boekstegers, P., Hinkel, R., Schinkel, S., Leuchs, B., Ludwig, J., Qiu, G., *et al.* (2011). Cardiac AAV9-S100A1 Gene Therapy Rescues Post-Ischemic Heart Failure in a Preclinical Large Animal Model. *Science Translational Medicine* 3, 92ra64-92ra64.
- Ponikowski, P., Voors, A.A., Anker, S.D., Bueno, H., Cleland, J.G.F., Coats, A.J.S., Falk, V., González-Juanatey, J.R., Harjola, V.-P., Jankowska, E.A., *et al.* (2016). 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European heart journal* 37, 2129-2200.
- Prakoso, D., De Blasio, M.J., Qin, C., Rosli, S., Kiriazis, H., Qian, H., Du, X.J., Weeks, K.L., Gregorevic, P., McMullen, J.R., *et al.* (2017). Phosphoinositide 3-kinase (p110 α) gene delivery limits diabetes-induced cardiac NADPH oxidase and cardiomyopathy in a mouse model with established diastolic dysfunction. *Clin Sci* 131, 1345-1360.

- Prudner, B.C., Roy, P.S., Damron, D.S., and Russell, M.A. (2014). alpha-Synemin localizes to the M-band of the sarcomere through interaction with the M10 region of titin. *FEBS letters* 588, 4625-4630.
- Raake, P.W.J., Schlegel, P., Ksienzyk, J., Reinkober, J., Barthelmes, J., Schinkel, S., Pleger, S., Mier, W., Haberkorn, U., Koch, W.J., *et al.* (2012). AAV6.βARKct cardiac gene therapy ameliorates cardiac function and normalizes the catecholaminergic axis in a clinically relevant large animal heart failure model. *European heart journal* 34, 1437-1447.
- Radke, M.H., Peng, J., Wu, Y., McNabb, M., Nelson, O.L., Granzier, H., and Gotthardt, M. (2007). Targeted deletion of titin N2B region leads to diastolic dysfunction and cardiac atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3444-3449.
- Radke, M.H., Polack, C., Methawasin, M., Fink, C., Granzier, H.L., and Gotthardt, M. (2019). Deleting Full Length Titin Versus the Titin M-Band Region Leads to Differential Mechanosignaling and Cardiac Phenotypes. *Circulation* 139, 1813-1827.
- Rando, T.A. (2001). Role of nitric oxide in the pathogenesis of muscular dystrophies: a "two hit" hypothesis of the cause of muscle necrosis. *Microsc Res Tech* 55, 223-235.
- Rao, T.P., and Kuhl, M. (2010). An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res* 106, 1798-1806.
- Raynaud, F., Astier, C., and Benyamin, Y. (2004). Evidence for a direct but sequential binding of titin to tropomyosin and actin filaments. *Biochim Biophys Acta* 2, 171-178.
- Raynaud, F., Fernandez, E., Coulis, G., Aubry, L., Vignon, X., Bleimling, N., Gautel, M., Benyamin, Y., and Ouali, A. (2005). Calpain 1-titin interactions concentrate calpain 1 in the Z-band edges and in the N2-line region within the skeletal myofibril. *Febs J* 272, 2578-2590.
- Rebolledo, B., Lai, N.C., Gao, M.H., Takahashi, T., Roth, D.M., Baird, S.M., and Hammond, D.H.K. (2006). Adenylylcyclase Gene Transfer Increases Function of the Failing Heart. *Human gene therapy* 17, 1043-1048.
- Renier, N., Wu, Z., Simon, David J., Yang, J., Ariel, P., and Tessier-Lavigne, M. (2014). iDISCO: A Simple, Rapid Method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging. *Cell* 159, 896-910.
- Roberts, A.M., Ware, J.S., Herman, D.S., Schafer, S., Baksi, J., Bick, A.G., Buchan, R.J., Walsh, R., John, S., Wilkinson, S., *et al.* (2015). Integrated allelic, transcriptional, and phenomic dissection of the cardiac effects of titin truncations in health and disease. *Science Translational Medicine* 7, 270ra276-270ra276.
- Rossi, A., and Salvetti, A. (2016). Intégration des vecteurs AAV et mutagenèse insertionnelle. *Med Sci (Paris)* 32, 167-174.
- Rubiś, P., Totoń-Żurańska, J., Wiśniowska-Śmiałek, S., Dziewięcka, E., Kołton-Wróź, M., Wołkow, P., Pitera, E., Rudnicka-Sosin, L., Garlitski, A.C., Gackowski, A., *et al.* (2018). The relationship between myocardial fibrosis and myocardial microRNAs in dilated cardiomyopathy: A link between mir-133a and cardiovascular events. *Journal of cellular and molecular medicine* 22, 2514-2517.
- Sadahiro, T., and Ieda, M. (2020). Direct Cardiac Reprogramming for Cardiovascular Regeneration and Differentiation. *Keio J Med* 9, 2019-0008.
- Sanderson, J.E., Lai, K.B., Shum, I.O., Wei, S., and Chow, L.T. Transforming growth factor-beta(1) expression in dilated cardiomyopathy (Heart. 2001 Dec;86(6):701-8. doi: 10.1136/heart.86.6.701.).
- Sang, H.Q., Jiang, Z.M., Zhao, Q.P., and Xin, F. (2015). MicroRNA-133a improves the cardiac function and fibrosis through inhibiting Akt in heart failure rats. *Biomed Pharmacother* 71, 185-189.
- Satoh, M., Takahashi, M., Sakamoto, T., Hiroe, M., Marumo, F., and Kimura, A. (1999). Structural Analysis of the Titin Gene in Hypertrophic Cardiomyopathy: Identification of a Novel Disease Gene. *Biochemical and biophysical research communications* 262, 411-417.
- Savarese, M., Sarparanta, J., Vihola, A., Udd, B., and Hackman, P. (2016). Increasing Role of Titin Mutations in Neuromuscular Disorders. *J Neuromuscul Dis* 3, 293-308.
- Schafer, S., de Marvao, A., Adami, E., Fiedler, L.R., Ng, B., Khin, E., Rackham, O.J., van Heesch, S., Pua, C.J., Kui, M., *et al.* (2017). Titin-truncating variants affect heart function in disease cohorts and the general population. *Nature genetics* 49, 46-53.
- Schild, D.P.R., Sascha I. ; Hellige, Jens G. ; Vogel, Rolf ; Arenja, Nisha (2019). Current Pathophysiological and Genetic Aspects of Dilated Cardiomyopathy, Vol Visions of Cardiomyocyte - Fundamental Concepts of Heart Life and Disease (intechopen).

Schiller, M., Javelaud, D., and Mauviel, A. (2004). TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *Journal of dermatological science* 35, 83-92.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* 9, 671-675.

Seo, H.H., Lee, S., Lee, C.Y., Lee, J., Shin, S., Song, B.W., Kim, I.K., Choi, J.W., Lim, S., Kim, S.W., *et al.* (2019). Multipoint targeting of TGF-beta/Wnt transactivation circuit with microRNA 384-5p for cardiac fibrosis. *Cell Death Differ* 26, 1107-1123.

Serose, A. (2007). Développement d'une nouvelle approche thérapeutique basée sur IGF-1 pour la cardiomyopathie dilatée dans un modèle de hamster déficient en delta-sarcoglycane. In UFR Institut d'Hématologie (Paris 7).

Shin, J., Tajrishi, M.M., Ogura, Y., and Kumar, A. (2013). Wasting mechanisms in muscular dystrophy. *Int J Biochem Cell Biol* 45, 2266-2279.

Shinde, A.V., and Frangogiannis, N.G. (2017). Mechanisms of Fibroblast Activation in the Remodeling Myocardium. *Current pathobiology reports* 5, 145-152.

Shindo, K., Asakura, M., Min, K.-D., Ito, S., Fu, H.Y., Yamazaki, S., Takahashi, A., Imazu, M., Fukuda, H., Nakajima, Y., *et al.* (2017). Cartilage Intermediate Layer Protein 1 Suppresses TGF- β Signaling in Cardiac Fibroblasts. *International Journal of Gerontology* 11, 67-74.

Shirokova, N., and Niggli, E. (2013). Cardiac phenotype of Duchenne Muscular Dystrophy: insights from cellular studies. *Journal of molecular and cellular cardiology* 58, 217-224.

Shuai, X.X., Meng, Y.D., Lu, Y.X., Su, G.H., Tao, X.F., Han, J., Xu, S.D., and Luo, P. (2016). Relaxin-2 improves diastolic function of pressure-overloaded rats via phospholamban by activating Akt. *Int J Cardiol* 218, 305-311.

Sinha, S., Heagerty, A.M., Shuttleworth, C.A., and Kielty, C.M. (2002). Expression of latent TGF-beta binding proteins and association with TGF-beta1 and fibrillin-1 following arterial injury. *Cardiovascular Research* 53, 971-983.

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

Snider, P., Standley, K.N., Wang, J., Azhar, M., Doetschman, T., and Conway, S.J. (2009). Origin of cardiac fibroblasts and the role of periostin. *Circulation Research* 105, 934-947.

Song, W., Wang, H., and Wu, Q. (2015). Atrial natriuretic peptide in cardiovascular biology and disease (NPPA). *Gene* 569, 1-6.

Song, Y., Yao, S., Liu, Y., Long, L., Yang, H., Li, Q., Liang, J., Li, X., Lu, Y., Zhu, H., *et al.* (2017). Expression levels of TGF- β 1 and CTGF are associated with the severity of Duchenne muscular dystrophy. *Exp Ther Med* 13, 1209-1214.

Souders, C.A., Bowers, S.L., and Baudino, T.A. (2009). Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res* 105, 1164-1176.

Stamler, J.S., and Meissner, G. (2001). Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev* 81, 209-237.

Stromberg, A., Darin, N., Kroksmark, A.K., and Tulinius, M. (2012). S.P.31 What was the age and cause of death in patients with Duchenne muscular dystrophy in Sweden during 2000–2010? *Neuromuscular Disorders* 22, 880-881.

Stöhr, E.J., Takayama H., Ferrari G. (2018). Stretch your heart but not too far: The role of titin mutations in dilated cardiomyopathy. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 156, 209-214.

Suckau, L., Fechner, H., Chemaly, E., Krohn, S., Hadri, L., Kockskämper, J., Westermann, D., Bisping, E., Ly, H., Wang, X., *et al.* (2009). Long-term cardiac-targeted RNA interference for the treatment of heart failure restores cardiac function and reduces pathological hypertrophy. *Circulation* 119, 1241-1252.

Tandon, A., Jefferies, J.L., Villa, C.R., Hor, K.N., Wong, B.L., Ware, S.M., Gao, Z., Towbin, J.A., Mazur, W., Fleck, R.J., *et al.* (2015). Dystrophin genotype-cardiac phenotype correlations in Duchenne and Becker muscular dystrophies using cardiac magnetic resonance imaging. *Am J Cardiol* 115, 967-971.

Tang, T., Gao, M.H., Roth, D.M., Guo, T., and Hammond, H.K. (2004). Adenylyl cyclase type VI corrects cardiac sarcoplasmic reticulum calcium uptake defects in cardiomyopathy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 287, H1906-H1912.

- Tao, H., Yang, J.-J., Shi, K.-H., and Li, J. (2016). Wnt signaling pathway in cardiac fibrosis: New insights and directions. *Metabolism* 65, 30-40.
- Tao, Z., Chen, B., Tan, X., Zhao, Y., Wang, L., Zhu, T., Cao, K., Yang, Z., Kan, Y.W., and Su, H. (2011). Coexpression of VEGF and angiopoietin-1 promotes angiogenesis and cardiomyocyte proliferation reduces apoptosis in porcine myocardial infarction (MI) heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 2064-2069.
- Tayal, U., Prasad, S., and Cook, S.A. (2017). Genetics and genomics of dilated cardiomyopathy and systolic heart failure. *Genome Medicine* 9, 20.
- Taylor, M., Graw, S., Sinagra, G., Barnes, C., Slavov, D., Brun, F., Pinamonti, B., Salcedo, E.E., Sauer, W., Pyxaras, S., *et al.* (2011). Genetic variation in titin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy-overlap syndromes. *Circulation* 124, 876-885.
- Tilemann, L., Lee, A., Ishikawa, K., Aguero, J., Rapti, K., Santos-Gallego, C., Kohlbrenner, E., Fish, K.M., Kho, C., and Hajjar, R.J. (2013). SUMO-1 gene transfer improves cardiac function in a large-animal model of heart failure. *Sci Transl Med* 5, 3006487.
- Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R.A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 349-363.
- Tonino, P., Kiss, B., Strom, J., Methawasin, M., Smith, J.E., Kolb, J., Labeit, S., and Granzier, H. (2017). The giant protein titin regulates the length of the striated muscle thick filament. *Nature Communications* 8, 1041.
- Tortora, G.J., and Reynolds Grabowski, S. (2001). *Principes d'anatomie et de physiologie*.
- Trinick, J. (1994). Titin and nebulin: protein rulers in muscle? *Trends in biochemical sciences* 19, 405-409.
- Trombitás, K., Wu, Y., Labeit, D., Labeit, S., and Granzier, H. (2001). Cardiac titin isoforms are coexpressed in the half-sarcomere and extend independently. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 281, H1793-H1799.
- Tuffery-Giraud, S., Beroud, C., Leturcq, F., Yaou, R.B., Hamroun, D., Michel-Calemard, L., Moizard, M.P., Bernard, R., Cossee, M., Boisseau, P., *et al.* (2009). Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase. *Hum Mutat* 30, 934-945.
- Udd, B., Vihola, A., Sarparanta, J., Richard, I., and Hackman, P. (2005). Titinopathies and extension of the M-line mutation phenotype beyond distal myopathy and LGMD2J. *Neurology* 64, 636-642.
- Umbarkar, P., Singh, A.P., Gupte, M., Verma, V.K., Galindo, C.L., Guo, Y., Zhang, Q., McNamara, J.W., Force, T., and Lal, H. (2019). Cardiomyocyte SMAD4-Dependent TGF-beta Signaling is Essential to Maintain Adult Heart Homeostasis. *JACC Basic Transl Sci* 4, 41-53.
- Vafiadaki, E., Arvanitis, D.A., Sanoudou, D., and Kranias, E.G. (2013). Identification of a protein phosphatase-1/phospholamban complex that is regulated by cAMP-dependent phosphorylation. *PLoS One* 8.
- Vallee, A., Levy, B.L., and Blacher, J. (2018). Interplay between the renin-angiotensin system, the canonical WNT/beta-catenin pathway and PPARgamma in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 20, 018-0860.
- Vallejo-Illarramendi, A., Toral-Ojeda, I., Aldanondo, G., and López de Munain, A. (2014). Dysregulation of calcium homeostasis in muscular dystrophies. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 16, e16.
- van den Bergen, J.C., Wokke, B.H., Janson, A.A., van Duinen, S.G., Hulsker, M.A., Ginjaar, H.B., van Deutekom, J.C., Aartsma-Rus, A., Kan, H.E., and Verschuuren, J.J. (2014). Dystrophin levels and clinical severity in Becker muscular dystrophy patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85, 747-753.
- van der Ven, P.F., and Furst, D.O. (1997). Assembly of titin, myomesin and M-protein into the sarcomeric M band in differentiating human skeletal muscle cells in vitro. *Cell Struct Funct* 22, 163-171.
- van Nieuwenhoven, F.A., Munts, C., op't Veld, R.C., González, A., Díez, J., Heymans, S., Schroen, B., and van Bilsen, M. (2017). Cartilage intermediate layer protein 1 (CILP1): A novel mediator of cardiac extracellular matrix remodelling. *Scientific Reports* 7, 16042.
- van Putten, M., Putker, K., Overzier, M., Adamzek, W.A., Pasteuning-Vuhman, S., Plomp, J.J., and Aartsma-Rus, A. (2019). Natural disease history of the D2-mdx mouse model for Duchenne

muscular dystrophy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, fj201802488R.

Verdonschot, J.A.J., Hazebroek, M.R., Derks, K.W.J., Barandiaran Aizpurua, A., Merken, J.J., Wang, P., Bierau, J., van den Wijngaard, A., Schalla, S.M., Abdul Hamid, M.A., *et al.* (2018). Titin cardiomyopathy leads to altered mitochondrial energetics, increased fibrosis and long-term life-threatening arrhythmias. *European heart journal* 39, 864-873.

Vohra, R., Batra, A., Forbes, S.C., Vandenborne, K., and Walter, G.A. (2017). Magnetic Resonance Monitoring of Disease Progression in mdx Mice on Different Genetic Backgrounds. *Am J Pathol* 187, 2060-2070.

Waghbi, M.C., de Souza, E.M., de Oliveira, G.M., Keramidas, M., Feige, J.J., Araújo-Jorge, T.C., and Bailly, S. (2009). Pharmacological inhibition of transforming growth factor beta signaling decreases infection and prevents heart damage in acute Chagas' disease. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53, 4694-4701.

Wang, J., Hoshijima, M., Lam, J., Zhou, Z., Jokiel, A., Dalton, N.D., Hultenby, K., Ruiz-Lozano, P., Ross, J., Jr., Tryggvason, K., *et al.* (2006). Cardiomyopathy associated with microcirculation dysfunction in laminin alpha4 chain-deficient mice. *J Biol Chem* 281, 213-220.

Wang, L.P., Fan, S.J., Li, S.M., Wang, X.J., Gao, J.L., and Yang, X.H. (2017). Oxidative stress promotes myocardial fibrosis by upregulating K(Ca)_v3.1 channel expression in AGT-REN double transgenic hypertensive mice. *Pflugers Arch* 469, 1061-1071.

Wang, Q., Maillard, M., Schibler, U., Burnier, M., and Gachon, F. (2010a). Cardiac hypertrophy, low blood pressure, and low aldosterone levels in mice devoid of the three circadian PAR bZip transcription factors DBP, HLF, and TEF. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 299, R1013-R1019.

Wang, Y.Y., Morimoto, S., Du, C.K., Lu, Q.W., Zhan, D.Y., Tsutsumi, T., Ide, T., Miwa, Y., Takahashi-Yanaga, F., and Sasaguri, T. (2010b). Up-regulation of type 2 iodothyronine deiodinase in dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 87, 636-646.

Watkins, S.C., Hoffman, E.P., Slayter, H.S., and Kunkel, L.M. (1988). Immunoelectron microscopic localization of dystrophin in myofibres. *Nature* 333, 863-866.

Weber, C., Neacsu, I., Krautz, B., Schlegel, P., Sauer, S., Raake, P., Ritterhoff, J., Jungmann, A., Remppis, A.B., Stangassinger, M., *et al.* (2013a). Therapeutic safety of high myocardial expression levels of the molecular inotrope S100A1 in a preclinical heart failure model. *Gene therapy* 21, 131.

Weber, K.T. (1989). Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *Journal of the American College of Cardiology* 13, 1637-1652.

Weber, K.T., Sun, Y., Bhattacharya, S.K., Ahokas, R.A., and Gerling, I.C. (2013b). Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart. *Nat Rev Cardiol* 10, 15-26.

Weeks, K.L., Gao, X., Du, X.-J., Boey, E.J.H., Matsumoto, A., Bernardo, B.C., Kiriazis, H., Cemerlang, N., Tan, J.W., Tham, Y.K., *et al.* (2012). Phosphoinositide 3-Kinase p110 α ; Is a Master Regulator of Exercise-Induced Cardioprotection and PI3K Gene Therapy Rescues Cardiac Dysfunction. *Circulation: Heart Failure* 5, 523-534.

Wei, B., and Jin, J.P. (2016). TNNT1, TNNT2, and TNNT3: Isoform genes, regulation, and structure-function relationships. *Gene* 582, 1-13.

Wei, S., Chow, L.T., Shum, I.O., Qin, L., and Sanderson, J.E. (1999). Left and right ventricular collagen type I/III ratios and remodeling post-myocardial infarction. *J Card Fail* 5, 117-126.

Wells, D.J. (2018). Tracking progress: an update on animal models for Duchenne muscular dystrophy. *Dis Model Mech* 11.

Williams, I.A., and Allen, D.G. (2007). Intracellular calcium handling in ventricular myocytes from mdx mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 292, 29.

Wittlieb-Weber, C.A., Knecht, K.K., Villa, C.R., Cunningham, C., Bock, M.J., Gambetta, K.E., Lal, A.K., Schumacher, K.R., Law, S.P., Deshpande, S.R., *et al.* (2019). Risk Factors for Cardiac Causes of Death in Males with Duchenne Muscular Dystrophy. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 38, S116-S117.

Woitek, F., Zentilin, L., Hoffman, N.E., Powers, J.C., Ottiger, I., Parikh, S., Kulczycki, A.M., Hurst, M., Ring, N., Wang, T., *et al.* (2015). Intracoronary Cytoprotective Gene Therapy: A Study of VEGF-B167 in a Pre-Clinical Animal Model of Dilated Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 66, 139-153.

- Wu, Y., Liu, X., Zheng, H., Zhu, H., Mai, W., Huang, X., and Huang, Y. (2020). Multiple Roles of sFRP2 in Cardiac Development and Cardiovascular Disease. *International journal of biological sciences* *16*, 730-738.
- Xia, P., Liu, Y., and Cheng, Z. (2016). Signaling Pathways in Cardiac Myocyte Apoptosis. *BioMed research international* *2016*, 9583268.
- Xian, S., Li, J., and Zhang, Z. (2020). miR-26b inhibits isoproterenol-induced cardiac fibrosis via the Keap1/Nrf2 signaling pathway. *Exp Ther Med* *19*, 2067-2074.
- Xiang, F.L., Fang, M., and Yutzey, K.E. (2017). Loss of beta-catenin in resident cardiac fibroblasts attenuates fibrosis induced by pressure overload in mice. *Nat Commun* *8*, 712.
- Xu, J., Li, Z., Ren, X., Dong, M., Li, J., Shi, X., Zhang, Y., Xie, W., Sun, Z., Liu, X., *et al.* (2015). Investigation of Pathogenic Genes in Chinese sporadic Hypertrophic Cardiomyopathy Patients by Whole Exome Sequencing. *Sci Rep* *5*.
- Xu, K.Y., Huso, D.L., Dawson, T.M., Bredt, D.S., and Becker, L.C. (1999). Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 657-662.
- Xu, R., Jia, Y., Zygmunt, D.A., and Martin, P.T. (2019). rAAVrh74.MCK.GALGT2 Protects against Loss of Hemodynamic Function in the Aging mdx Mouse Heart. *Mol Ther* *27*, 636-649.
- Yoon, P.O., Lee, M.-A., Cha, H., Jeong, M.H., Kim, J., Jang, S.P., Choi, B.Y., Jeong, D., Yang, D.K., Hajjar, R.J., *et al.* (2010). The opposing effects of CCN2 and CCN5 on the development of cardiac hypertrophy and fibrosis. *Journal of molecular and cellular cardiology* *49*, 294-303.
- Young, P., Ferguson, C., Banuelos, S., and Gautel, M. (1998). Molecular structure of the sarcomeric Z-disk: two types of titin interactions lead to an asymmetrical sorting of alpha-actinin. *The EMBO journal* *17*, 1614-1624.
- Yucel, N., Chang, A.C., Day, J.W., Rosenthal, N., and Blau, H.M. (2018). Humanizing the mdx mouse model of DMD: the long and the short of it. *NPJ Regen Med* *3*, 018-0045.
- Yung, C.K., Halperin, V.L., Tomaselli, G.F., and Winslow, R.L. (2004). Gene expression profiles in end-stage human idiopathic dilated cardiomyopathy: altered expression of apoptotic and cytoskeletal genes. *Genomics* *83*, 281-297.
- Zahradka, P. (2008). Novel Role for Osteopontin in Cardiac Fibrosis. *Circulation Research* *102*, 270-272.
- Zastrow, M.S., Flaherty, D.B., Benian, G.M., and Wilson, K.L. (2006). Nuclear titin interacts with A- and B-type lamins in vitro and in vivo. *Journal of cell science* *119*, 239-249.
- Zhai, C.-G., Xu, Y.-Y., Tie, Y.-Y., Zhang, Y., Chen, W.-Q., Ji, X.-P., Mao, Y., Qiao, L., Cheng, J., Xu, Q.-B., *et al.* (2018). DKK3 overexpression attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis in an angiotensin-perfused animal model by regulating the ADAM17/ACE2 and GSK-3 β / β -catenin pathways. *Journal of molecular and cellular cardiology* *114*, 243-252.
- Zhan, T., Rindtorff, N., and Boutros, M. (2017). Wnt signaling in cancer. *Oncogene* *36*, 1461-1473.
- Zhang, C.-L., Zhao, Q., Liang, H., Qiao, X., Wang, J.-Y., Wu, D., Wu, L.-L., and Li, L. (2018). Cartilage intermediate layer protein-1 alleviates pressure overload-induced cardiac fibrosis via interfering TGF- β 1 signaling. *Journal of molecular and cellular cardiology* *116*, 135-144.
- Zhang, Y., Liu, Y., Zhu, X.H., Zhang, X.D., Jiang, D.S., Bian, Z.Y., Zhang, X.F., Chen, K., Wei, X., Gao, L., *et al.* (2014). Dickkopf-3 attenuates pressure overload-induced cardiac remodelling. *Cardiovasc Res* *102*, 35-45.
- Zhao, C., Jiang, J., Wang, Y.L., and Wu, Y.Q. (2019). Overexpression of microRNA-590-3p promotes the proliferation of and inhibits the apoptosis of myocardial cells through inhibition of the NF- κ B signaling pathway by binding to RIPK1. *J Cell Biochem* *120*, 3559-3573.
- Zhao, X., Wang, K., Liao, Y., Zeng, Q., Li, Y., Hu, F., Liu, Y., Meng, K., Qian, C., Zhang, Q., *et al.* (2015). MicroRNA-101a Inhibits Cardiac Fibrosis Induced by Hypoxia via Targeting TGF β RI on Cardiac Fibroblasts. *Cellular Physiology and Biochemistry* *35*, 213-226.
- Zhou, Q., Schötterl, S., Backes, D., Brunner, E., Hahn, J.K., Ionesi, E., Aidery, P., Sticht, C., Labeit, S., Kandolf, R., *et al.* (2017). Inhibition of miR-208b improves cardiac function in titin-based dilated cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology* *230*, 634-641.
- Zhou, Y., Shiok, T.C., Richards, A.M., and Wang, P. (2018). MicroRNA-101a suppresses fibrotic programming in isolated cardiac fibroblasts and in vivo fibrosis following trans-aortic constriction. *Journal of molecular and cellular cardiology* *121*, 266-276.

Zhu, T., Zhou, L., Mori, S., Wang, Z., McTiernan, C.F., Qiao, C., Chen, C., Wang, D.W., Li, J., and Xiao, X. (2005). Sustained whole-body functional rescue in congestive heart failure and muscular dystrophy hamsters by systemic gene transfer. *Circulation* *112*, 2650-2659.

Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., and Rabinowitz, J.E. (2008). Analysis of AAV Serotypes 1–9 Mediated Gene Expression and Tropism in Mice After Systemic Injection. *Molecular Therapy* *16*, 1073-1080.

Zou, J., Tran, D., Baalbaki, M., Tang, L.F., Poon, A., Pelonero, A., Titus, E.W., Yuan, C., Shi, C., Patchava, S., *et al.* (2015). An internal promoter underlies the difference in disease severity between N- and C-terminal truncation mutations of Titin in zebrafish. *eLife* *4*, e09406.

Titre : De la caractérisation de la cardiomyopathie dilatée à la modulation à visée thérapeutique des voies de signalisation impliquées dans le phénotype cardiaque de myopathies d'origine génétique.

Mots clés : titine, dystrophine, cardiomyopathie dilatée, Fibrose cardiaque, Myopathie génétique

Résumé : La cardiomyopathie dilatée est la forme la plus courante d'atteinte cardiaque associée aux myopathies d'origine génétiques. Elle est caractérisée par une hypokinésie du myocarde et une dilatation des cavités cardiaques, qui sont liés à un remodelage cardiaque important sous la forme d'une atteinte des cardiomyocytes associée à la présence de fibrose. Les DCM constituent actuellement la principale cause d'insuffisance cardiaque et de transplantation cardiaque. Parmi les myopathies, deux des formes les plus fréquemment associées à des atteintes cardiaques, sont les déficiences en titine et en dystrophine. La titine est une protéine géante qui joue un rôle crucial dans l'intégrité du sarcomère et la tension passive musculaire, notamment dans le cœur. La dystrophine, dont les mutations conduisent à la dystrophie musculaire de Duchenne est une protéine de la structure du sarcolemme indispensable au maintien de l'architecture et à l'intégrité des fibres musculaires au cours des contractions. L'objectif de l'étude était, à partir de la caractérisation de 2 modèles portant des mutations dans les deux gènes d'intérêt, de définir des perturbations moléculaires qui pourraient être ciblées par des approches thérapeutiques.

La caractérisation du muscle strié squelettique et du cœur du modèle Titine a été faite à plusieurs niveaux : morphologique, fonctionnel et moléculaire. Elle a permis de mettre en évidence un phénotype cardiaque de type cardiomyopathie dilatée avec une diminution de la fonction systolique et une importante dilatation du ventricule gauche associées à la mise en place d'un important tissu fibrotique. Le modèle dystrophine était déjà caractérisé dans la littérature. L'évaluation du transcriptome cardiaque par un séquençage de l'ARN dans les deux modèles a permis d'identifier des cascades moléculaires communes impliquées dans l'insuffisance cardiaque. Enfin, l'effet de la modulation de ces voies sur le phénotype cardiaque du modèle Titine, le plus sévère, a été évalué par des approches pharmacologiques inhibitrices et par l'utilisation de vecteurs de transfert de gène ciblant des gènes fortement dérégulés. La modulation de ces voies a permis l'atténuation de certains paramètres de la cardiomyopathie dans le modèle titine. Ces modulations seront maintenant effectuées sur le modèle dystrophine afin de définir si les approches peuvent être généralisées et donc représenter une piste pour des approches génériques de la cardiomyopathie.

Title : From dilated cardiomyopathy characterization to therapeutic modulation of signaling pathways involved in the cardiac phenotype of genetic myopathies.

Keywords : titin, dystrophin, dilated cardiomyopathy, genetic myopathy, heart fibrosis

Abstract : Dilated cardiomyopathy (DCM) is the most common form of heart disease associated with genetic myopathies. It is characterized by myocardial hypokinesia and dilation of the heart chambers, which are linked to significant cardiac remodeling with cardiomyocyte damage and fibrosis. DCM is currently the leading cause of heart failure and heart transplantation. Among the myopathies, titin and dystrophin deficiencies are 2 of the most frequent forms associated with cardiac damage. Titin is a giant protein that plays a crucial role in the integrity of the sarcomere and passive muscle tension, especially in the heart. Dystrophin, encoded by DMD, is a structural protein of the sarcolemma, essential for maintaining the architecture and integrity of muscle fibers during muscle contraction. Mutations in DMD leads to Duchenne muscular dystrophy. The objective of this study was from the characterization of 2 models carrying mutations in the 2 genes of interest, to define modified molecular pathways which could be targeted by therapeutic approaches.

Characterization of the skeletal muscle and heart of the titin model was made on morphological, functional and molecular levels. The characterization highlights a cardiac phenotype of DCM with decrease in systolic function and dilation of the left ventricle associated with fibrotic tissue. The dystrophin model was already characterized in the literature. The evaluation of the cardiac transcriptome by RNA sequencing in the 2 models allowed identification of common molecular cascades implicated in heart failure. Finally, the effect of modulating these pathways on the cardiac phenotype of the titin model, the most severe, was evaluated by pharmacological inhibitors and by gene transfer vectors targeting highly dysregulated genes. The modulation of these pathways allowed the decrease of some DCM parameters in the model. These modulations will now be carried out on the dystrophin model in order to define if these approaches can be generalized and therefore represent a target for generic approaches of dilated cardiomyopathy.