



Une approche thérapeutique basée sur les cellules souches musculaires en dystrophie myotonique de type 1

Mémoire

Mokhtari Inès

**Maîtrise en sciences cliniques et biomédicales de l'Université Laval
offert en extension à l'Université du Québec à Chicoutimi**

Maître ès sciences (M. Sc.)

Département des sciences de la santé Université du Québec à Chicoutimi
Chicoutimi, Canada

Québec, Canada,

© Inès Mokhtari, 2021

Une approche thérapeutique basée sur les cellules souches musculaires en dystrophie myotonique de type 1

Mémoire

Mokhtari Inès

Sous la direction de :

Elise Duchesne, directrice
Nicolas Dumont, codirecteur

Résumé

La dystrophie myotonique de type 1 (DM1) est une maladie héréditaire dominante où le muscle squelettique est sévèrement affecté. Les personnes atteintes présentent une faiblesse musculaire, une perte progressive de la force musculaire et de l'atrophie. La fonction des cellules souches musculaires (CSM) est également altérée en DM1 en présentant notamment un profil de sénescence prématurée, une capacité de prolifération et de fusion diminuée, mais aussi une différenciation en myotubes retardée. Le profil inflammatoire élevé mesuré chez les individus atteints de DM1 pourrait être, du moins en partie, responsable de l'altération de leur fonction. Actuellement, cette maladie reste incurable, mais il y a un haut potentiel thérapeutique dans le développement de stratégies permettant de restaurer la fonction des CSM. De plus, cette avenue demeure inexplorée. Afin de permettre l'avancement des connaissances dans ce domaine de recherche, ce mémoire présente un travail de recherche visant à développer une nouvelle avenue thérapeutique ciblant la fonction altérée des CSM ainsi que l'inflammation potentiellement présente au niveau musculaire en DM1. Pour répondre à ces objectifs, la force musculaire de 4 groupes musculaires a été mesurée chez 103 participants atteints de DM1, exprimée en valeur prédite, puis comparée entre les individus présentant des niveaux sériques normaux ou anormaux de cytokines pro inflammatoires. De plus, à partir de biopsies musculaires prélevées chez 10 patients DM1 et 15 sujets sains, la densité de cellules inflammatoires (macrophages) a été quantifiée dans les tissus musculaires DM1 et comparée aux tissus contrôles. Des CSM ont aussi été isolées à partir de ces biopsies et utilisées afin d'évaluer le niveau d'expression de certains gènes inflammatoires par technique de séquençage de cellules uniques et d'évaluer l'effet de certains médiateurs lipidiques sur la fonction CSM et ainsi que sur l'expression de certains gènes de l'inflammation. Les résultats de cette étude ont été présentés dans la production d'un article original portant sur l'étude des médiateurs lipidiques sur la fonction des CSM en DM1. En plus de confirmer l'inflammation systémique (sang) documentée chez les individus atteints de DM1, les résultats obtenus démontrent une inflammation locale (tissu musculaire et CSM) chez ceux-ci. Aussi, l'ajout exogène de certaines molécules appartenant à cette famille de médiateurs, dont certaines résolvines et marésines, améliore la prolifération, la différenciation et la fusion des CSM, et diminue significativement l'expression de certains gènes de l'inflammation. Ainsi, cette classe de médiateurs

représente un nouvel espoir thérapeutique dans le développement de thérapies ciblant les fonctions altérées des CSM, mais également dans la résolution de l'inflammation en DM1 et autres maladies inflammatoires.

Abstract

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is a dominant disease characterized by severely affected skeletal muscles. Individuals with DM1 experienced muscle weakness, progressive loss of muscle strength and atrophy. The function of muscle stem cells (MSC) is also altered in DM1 and they exhibit a premature senescence profile, decreased proliferation and fusion capacity and delayed differentiation into myotubes. At least, the highly inflammatory profile could be responsible of the impairment of their functions. Currently, there is no cure for this disease, but there is a high therapeutic potential in the development of strategies to restore MSC function. Moreover, this avenue remains unexplored. To increase knowledge in this field of research, this thesis presents an original manuscript on the study of lipid mediators on MSC function in DM1. In addition to confirm the systemic inflammation (blood) documented in DM1 patients, the results obtained demonstrate a local inflammation (in muscle tissue and MSC) in DM1 patients. Also, the exogenous addition of lipid mediators including resolvin and maresins family improves the proliferation, differentiation and fusion of MSC and significantly decreases the expression of inflammation genes. Thus, this class of mediators represents a new therapeutic hope to rescue MSC function and decrease inflammatory profile associated with DM1.

Table des matières

Résumé.....	II
Abstract.....	IV
Liste des tableaux.....	VII
Liste des figures.....	VIII
Liste des abréviations.....	IX
Remerciements.....	XI
Avant-propos.....	XII
Introduction.....	1
<i>Mise en contexte</i>	2
Chapitre 1 - État des connaissances.....	3
1.1 Épidémiologie.....	4
1.2 Cause génétique et phénotypes cliniques.....	4
1.3 Pathophysiologie.....	7
1.3.1 Conséquences des ARN messagers toxiques.....	7
1.3.2 Halpoin suffisance du gène DMPK.....	8
1.3.3 Implication des gènes avoisinants du gène <i>DMPK</i>	9
1.4 Description du muscle squelettique.....	10
1.5 Architecture du muscle squelettique.....	10
1.6 Homéostasie musculaire.....	11
1.7 Myogenèse et cellules satellites.....	13
1.8 Inflammation.....	15
1.8.1 Inflammation dans un contexte de muscle sain.....	15
1.8.2 Inflammation dans un contexte de dystrophie musculaire.....	17
1.9 Description des médiateurs lipidiques.....	19
1.10 Action des médiateurs lipidiques.....	21
1.10.1 Action des médiateurs lipidiques sur l'inflammation.....	21
1.10.2 Action des médiateurs lipidiques dans le muscle.....	22
1.10.3 Implications des médiateurs lipidiques dans d'autres maladies.....	23
1.11 Problématique de recherche.....	24
Chapitre 2 - Objectifs et hypothèses.....	26
2.1 Objectifs.....	27
2.2 Hypothèses.....	27
Chapitre 3 - Méthodologie, résultats et discussion.....	28
Targeting muscle stem cells as a therapeutic approach to mitigate myotonic dystrophy type 1.....	29
3.1 RÉSUMÉ.....	30
3.2 ABSTRACT.....	31
3.3 INTRODUCTION.....	32
3.4 METHODS.....	34
3.4.1 Participants.....	34
3.4.2 Muscle strength and pro-inflammatory cytokines blood sample analyses.....	34
3.4.3 Muscle biopsy.....	35
3.4.4 Muscle stem cell isolation, purification and primary myoblast culture.....	35
3.4.5 qRT-PCR.....	36
3.4.6 Immunofluorescence.....	36
3.4.7 Single cell RNA-sequencing.....	37

3.4.8	Statistical analysis.	37
3.5	RESULTS	38
3.5.1	Participants	38
3.5.2	Systemic inflammatory markers are associated with muscle weakness in DM1.	38
3.5.3	Signs of local inflammation in skeletal muscle of DM1 patients.	39
3.5.4	Specialized pro-resolving mediators reduce the pro-inflammatory profile of DM1 myoblasts.	40
3.5.5	Specialized pro-resolving mediators restore myogenesis capacity of DM1 myoblasts.	40
3.6	DISCUSSION	47
3.7	Study limitations	51
3.8	CONCLUSION	51
3.9	REFERENCES	55
Chapitre 4	: Discussion	59
4.1	Limites de l'étude	61
4.2	Perspectives	62
Conclusion	64
Références	65

Liste des tableaux

Table 1: Comparison of muscle strength between participants based on their blood concentration of IL6 and TNF α	41
Table 2. DM1 participants characteristics for blood analyses	53
Table 3 : DM1 and healthy control participants characteristics for muscular stem cells and tissue analyses	54

Liste des figures

Introduction

Figure 1. Distribution du nombre de répétitions de cytosine-thymine-guanine (CTG) dans les cinq formes cliniques de la dystrophie myotonique de type 1 (DM1).....	5
Figure 2. Taille de la répétition du triple CTG selon le sexe dans les formes cliniques..	6
Figure 3. Protéines de liaison dérégulées en DM1 par les ARNm toxiques.	8
Figure 4. Architecture du muscle squelettique.....	11
Figure 5. Illustration des étapes du processus myogénique et des facteurs de transcription impliqués.....	15
Figure 6. Illustration des différents types de cellules impliquées dans la réparation du muscle à la suite d'une blessure.....	17
Figure 7. Décours temporel de la présence des cellules immunitaires après une lésion	18
Figure 8. Origine des médiateurs lipidiques.	21

Chapitre 3

Figure 1: M1 and M2 macrophage quantification	40
Figure 2: Single cell RNAseq	41
Figure 3: Effects of lipid mediators on inflammatory gene expression	42
Figure 1: Effects of lipid mediators on proliferation	44
Figure 5: Effects of lipid mediators on differentiation	45
Figure 6: MTS viability essay	54

Liste des abréviations

Abréviation	Définition
DM1	Dystrophie myotonique de type 1
SLSJ	Saguenay Lac Saint Jean
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
CTG	Triplet de nucléotide de cytosine, thymine et guanine
DMPK	Gène Dystrophy Myotonic Protein Kinase
ARNm	ARN messenger
CUG	Triplet de nucléotide de cytosine, uracile et thymine
CUGBP1	CUG triplet repeat, RNA binding protein 1
MBNL1	Muscle blind-like protein 1
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
DMWD	DM1 Locas, WD containing
Six5	Gène SIX Homeobox 5
DMAHP	DM locus- associated homeodomain protein
FoxO	Forkhead box protein O
MuRF1	Muscle ring finger protein 1
Akt	Protéine kinase B
MTOR	Mechanistic target of rapamycin
CSM	Cellules souches musculaires
Pax7	Paired box protein
Myf5	Myogenic factor 5
DAMP	Damage-associated molecular patterns
MyoD	Myoblast determination protein 1
MyoG	Myogenine
DAMPs	Damage-associated molecular pattern
Foxk1	Forkhead box protein K1
Sox15	SRY-box transcription factor 15
IFN γ	Interféron gamma
IL	Interleukine
TGF β -1	Transforming growth factor 1
EPA	Acide eicosapentaénoïque
DHA	Acide docosahexaénoïque
LOX	Lipoxygénases
COX	Cyclooxygénase
PGE2	Prostaglandine E2
Rv	Résolvine
PMN	Neutrophile polymorphonucléaire
LXA4	Lipoxine A4
FPR	Formy peptide receptor
GPR	G protein-coupled receptor
PD1	Protectine D1
MR	Marésines
Wnt	Wingless-related integration site
IGF-1	Insulin-like growth hormone 1
FGF	Fibroblast growth factor
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
Pax 7	Pair box protein 7

NF- κ B	NF-kappaB
DMD	Dystrophie musculaire de Duchenne
Souris WT	Souris type sauvage
Souris dmx	Souris avec le gène dystrophine muté
Souris DMSXL	Souris avec plus de 1000 répétitions CTG
FAPs	Fibro adipogenic progenitors
BaCL2	Barium Chloride
CXCL	Chemokine ligand
CELF-1	CUGBP Elav-Like family member 1
Cmklr1	Chemerin Chemokine-Like Receptor 1
ID1	Inhibitor of DNA binding 1
CENPF	Centromere protein F
MyHC 1	Myosin Heavy Chain 1
EGFR1	Epidermal Growth Factor Receptor 1
ALX	Lipoxin receptor

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice Elise Duchesne de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer une maîtrise, mais également de m'avoir initié à la recherche. Je la remercie également d'avoir accepté que j'effectue la totalité de ma maîtrise à Montréal. Merci également à toute l'équipe de recherche du laboratoire.

Merci à mon co-directeur Nicolas Dumont de m'avoir accueillie dans son laboratoire durant ces deux années de maîtrise, mais également pour sa disponibilité et ses conseils. Merci également à toute l'équipe de recherche.

Merci à Talita Conte et à Thomas Molina de m'avoir épaulée tant sur le côté professionnel que personnel.

Je tiens à remercier également les organismes subventionnaires tels que le réseau ThéCell puis le Centre d'excellence en recherche sur les maladies orphelines – Fondation Courtois (CERMO-FC) pour avoir financé mon projet.

Enfin, merci aux patients de nous fournir ce précieux matériel biologique pour faire avancer la science et les connaissances en DM1.

Avant-propos

Ce mémoire est divisé en trois sections. La première section décrit la dystrophie myotonique de type 1 en fonction des connaissances actuelles. Elle décrit également le muscle squelettique et ses atteintes en DM1. Une partie de cette section est consacrée aux cellules souches musculaires, lesquelles sont au cœur du projet. Enfin, la description des médiateurs lipidiques et leur implication dans plusieurs maladies seront également abordées. Ensuite, la 2^e section contient un article en préparation englobant l'ensemble des résultats obtenus au cours de mes deux années de maîtrise. Finalement, la 3^e section comporte une discussion ainsi qu'une conclusion générale.

Durant ce projet, j'ai tout d'abord été formée aux techniques de laboratoire par la Dre Talita Conte au sein du laboratoire de mon co-directeur Dr Nicolas Dumont. La Dre Ornella Pellerito a également été présente pour m'assister dans les analyses d'immunofluorescence.

Ma directrice de recherche Dre Elise Duchesne et mon co-directeur Dr Nicolas Dumont m'ont assistée et accompagnée durant toutes les expériences réalisées, mais également dans la correction et dans l'évaluation du mémoire et de l'article.

Le devis expérimental a été élaboré par ma directrice Dre Elise Duchesne et mon co-directeur Dr Nicolas Dumont. L'auteure de ce mémoire a effectué la partie expérimentale puis a rédigé l'article. Ce dernier a été corrigé par la Dre Elise Duchesne et le Dr Nicolas Dumont. Celui-ci fera l'objet d'une soumission au journal *Skeletal Muscle* en avril 2022.

Introduction

Mise en contexte

La dystrophie myotonique de type 1 (DM1) est une maladie rare et multisystémique touchant l'ensemble du corps humain. Le muscle squelettique des patients est particulièrement affecté et les personnes atteintes présentent une faiblesse et de l'atrophie musculaire. Ces deux caractéristiques sont donc des signes cardinaux de la maladie. Ces atteintes musculaires sont principalement dues à une atteinte des fonctions des cellules souches musculaires (CSM) qui perdent leur capacité à exercer leur fonction, soit le développement musculaire puis la réparation du muscle à la suite d'une lésion via le processus de myogenèse. Des résultats préliminaires obtenus dans le cadre d'une étude longitudinale dans laquelle est impliqué le laboratoire du Dre Duchesne (Table 1) ont démontré que les personnes atteintes de DM1 avec un profil inflammatoire systémique anormalement élevé présentaient une force musculaire significativement inférieure à celles présentant un profil inflammatoire normal. Actuellement, aucun traitement n'est disponible sur le marché pour cette maladie rare. Cependant, une étude effectuée par l'équipe du Dr Dumont, a permis de mettre en évidence les propriétés anti-inflammatoires de molécules bioactives nommées médiateurs lipidiques dans un contexte de dystrophie musculaire. Aucune étude dans la littérature ne démontre l'efficacité de ces molécules dans la DM1, ce projet a donc permis de répondre à la question de recherche suivante : les médiateurs lipidiques permettent-ils de restaurer la fonction des CSM et d'atténuer l'inflammation en DM1 ?

L'ensemble du mémoire de recherche incluant l'article scientifique répond à cette problématique. Ainsi, ce mémoire se divise en plusieurs chapitres. Le premier présente l'état des connaissances portant sur cette question de recherche. Le second expose la problématique, les objectifs puis les hypothèses de recherche. Enfin, le troisième chapitre correspond à l'article scientifique présentant l'ensemble des résultats du projet.

Chapitre 1 - État des connaissances

1.1 Épidémiologie

La dystrophie myotonique de type 1 (DM1) est une maladie héréditaire, aussi connue sous le nom de maladie de Steinert, représentant la myopathie la plus fréquente chez l'adulte¹. L'estimation de la prévalence de cette maladie se situe entre 5 et 20 par 100 000 individus et est estimée à 1 personne atteinte sur 8 000 mondialement². En Europe, la prévalence estimée est de 1/7400 et les études sur la population non européenne montrent que la prévalence est faible en Afrique subsaharienne à l'exception des descendants européens vivant en Afrique du Sud³. La prévalence est plus élevée dans certaines régions du monde dû à des effets fondateurs, notamment chez la population du Nord-Est du Québec.³ Ces effets fondateurs sont principalement expliqués par les colonisations historiques. Une étude a été menée afin d'expliquer ces effets en se basant sur les variations génétiques des populations au sein des régions de Charlevoix et du Saguenay–Lac-Saint-Jean (SLSJ) où 1 personne sur 475 est atteinte.⁴ Afin de mener cette étude, l'ADN de 50 familles originaires du SLSJ a été étudié et trois familles d'haplotypes ont été identifiées ainsi que l'âge de l'effet fondateur de chacune.⁵ Par exemple, pour l'haplotype appelé A1_21, l'âge estimé de l'effet fondateur est de neuf générations, ce qui correspond au début du 17^e siècle et à la colonisation des régions de Charlevoix et du SLSJ.⁵

1.2 Cause génétique et phénotypes cliniques

La DM1 est une maladie dite autosomale dominante causée par une répétition anormale d'un triplet de nucléotides : cytosine, thymine et guanine (CTG), dans la région 3' non-codante du gène *dystrophia myotonica protein kinase (DMPK)* situé sur le chromosome 19q.^{6,7} Chez les personnes saines, les répétitions restent inférieures à 35 tandis que chez les personnes atteintes, le triplet est répété jusqu'à des milliers de fois.

La DM1 est une maladie multisystémique touchant l'ensemble du corps humain, notamment les systèmes cardiaque, endocrinien, gastro-intestinal, visuel, pulmonaire, et plus particulièrement le système musculaire sur lequel le présent projet de recherche se concentre. Typiquement, la DM1 est divisée en cinq formes cliniques : congénitale, infantile, juvénile, adulte et tardif.⁸ Les personnes atteintes sont classées au sein de ces phénotypes selon l'âge d'apparition des symptômes et selon la gravité de ces derniers.⁹

En plus de cela, chaque forme clinique est corrélée avec le nombre de répétitions CTG comme démontré à la Figure 1.⁸ En effet, il existe une corrélation génotype/phénotype modérée de façon à ce que les répétitions les plus longues soient associées aux symptômes les plus graves et à un âge d'apparition plus précoce.¹⁰ Par exemple, une étude a mis en évidence que les répétitions du triplet peuvent aller jusqu'à 2000 répétitions chez les personnes avec la forme congénitale sévère.¹¹ Ces phénotypes présentent des caractéristiques cliniques différentes. D'abord, les personnes atteintes de la forme congénitale présentent de nombreuses déficiences telles que l'hypotonie, une faiblesse musculaire sévère ainsi que des troubles cognitifs.¹² Les formes infantiles et juvéniles sont considérées comme étant moins sévères que la forme congénitale, mais présentent des caractéristiques similaires telles que des troubles cognitifs.¹³ Cependant, la myotonie sévère est davantage présente dans la forme juvénile.⁸ La forme tardive est considérée comme la moins grave avec un nombre de répétitions plus faibles, mais est associée à des manifestations telles que la somnolence ou la présence de diabète.⁸ Ces mêmes atteintes sont retrouvées au sein de la forme adulte en plus de l'obésité. Cette forme est plus sévère que la forme tardive en raison des répétitions CTG plus élevées.⁸

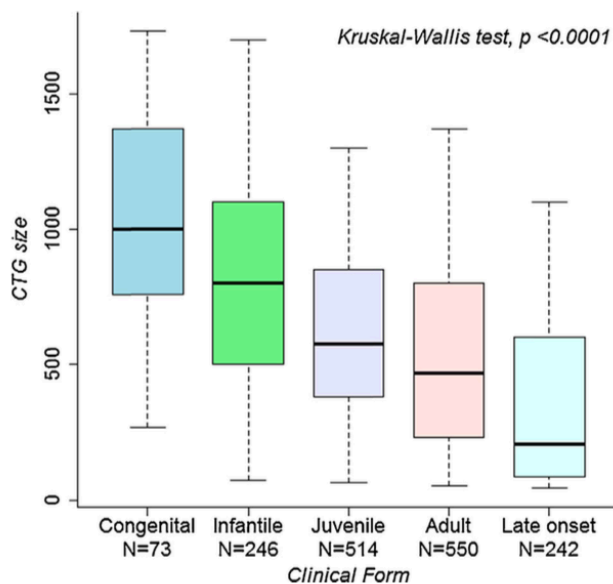


Figure 1. Distribution du nombre de répétitions de cytosine-thymine-guanine (CTG) dans les cinq formes cliniques de la dystrophie myotonique de type 1 (DM1)⁸. Chaque phénotype clinique est associé à un nombre de répétitions CTG allant de la forme la moins sévère à la plus sévère atteignant plus de 1000 répétitions. Tirée de De Antonio *et al.*⁸

Deux phénomènes importants liés à l’instabilité des répétitions CTG ont été documentés en DM1. Premièrement, le nombre de répétitions peut devenir plus élevé et plus instable d’une génération à l’autre par phénomène d’anticipation génétique. Selon ce phénomène, les répétitions CTG augmentent d’une génération à l’autre plus particulièrement par transmission maternelle.^{10,14} Il a d’ailleurs été démontré que la forme congénitale est transmise majoritairement par la mère tandis que la transmission paternelle est très rare.¹⁰ Le nombre de répétitions CTG peut également augmenter au cours de la vie des personnes atteintes et est différent d’une cellule à une autre par phénomène de mosaïque somatique.¹⁰ Par rapport à cette hétérogénéité dans le nombre de répétitions observée entre les différents tissus, les plus importantes ont été trouvées dans le muscle squelettique et le cœur, tandis que les expansions les plus petites ont été documentées dans le cortex frontal.¹⁰

Il est important de souligner que le sexe influence également la manifestation des symptômes. Tel que présenté à la Figure 2, le nombre de répétitions CTG est significativement différent selon les formes cliniques et les répétitions CTG.⁸ Cependant, au sein d’une même forme clinique, aucune différence dans la taille de l’expansion n’a été observée entre les hommes et les femmes.¹⁵ De plus, une étude montre que les femmes présentent plus fréquemment des cataractes et sont plus affectées socialement que les hommes.^{8, 16}

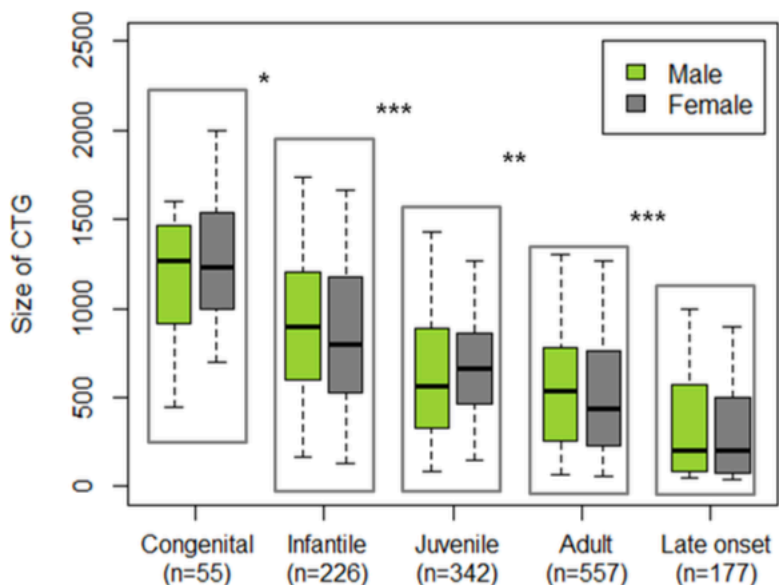


Figure 2. Taille de la répétition du triple CTG selon le sexe dans les formes cliniques.¹⁵ Les hommes et les femmes présentent des tailles de répétition CTG différente en fonction du phénotype clinique. Tirée de Dogan, C. *et al.*¹⁵

1.3 Pathophysiologie

Actuellement la pathophysiologie de cette maladie est méconnue, mais trois hypothèses sont actuellement retenues par la communauté scientifique et seront présentées dans les prochains paragraphes.

1.3.1 Conséquences des ARN messagers toxiques

La première hypothèse et la plus retenue par la communauté scientifique est celle de la présence d'ARN messagers (ARNm) toxiques (Figure 3). Les répétitions CTG anormalement élevées sont transcrites et conséquemment, entraînent la formation d'ARNm comprenant de longues répétitions CUG, lesquels sont considérés comme toxiques.¹⁷ En effet, ces longs ARNm se configurent sous forme de pince à cheveux et s'accumulent dans les cellules des patients sans être dégradés.¹⁷ Ces ARNm mutants se lient à certaines protéines de liaison perturbant ainsi leurs activités.¹⁷ En DM1, les deux protéines principalement affectées sont la protéine muscleblind-like 1 (MBNL1) et la protéine CUG-binding protein 1 (CUGBP1). En DM1, la protéine MBNL1 se lie aux ARNm toxiques et est retenue par ces derniers ; ainsi son activité est diminuée tandis que la protéine CUGBP1 est quant à elle surexprimée entraînant alors un défaut d'épissage.¹⁷ Une étude menée chez des souris DM1 a permis de démontrer que, dans le cerveau de ces souris, la séquestration des protéines MBNL1 par les ARNm contribue aux défauts d'épissage chez les mammifères atteints de DM1.¹⁸ De plus, plusieurs exons connus pour présenter des défauts d'épissage en DM1 ont été normalement épissés chez les mammifères présentant une délétion du gène MBNL1.¹⁸ Le rôle de CUGBP1 a été démontré dans un modèle murin où lorsque la protéine CUGBP1 était surexprimée, les muscles squelettiques des souris développaient une atrophie des myofibrilles associée à une augmentation des infiltrats inflammatoires et à une dégénérescence des fibres ainsi qu'à une accumulation de petites fibres.¹⁹ Les souris transgéniques surexprimant CUGBP1 (induit par la doxycycline et spécifique au muscle squelettique) ont permis de montrer que la surexpression de cette protéine entraîne les mêmes défauts physiologiques et moléculaires que ceux observés dans le tissu musculaire des patients atteints de DM1.¹⁹ Par exemple, il a été démontré que le niveau d'expression de CUGBP1 est lié à la

diminution des propriétés fonctionnelles des muscles.¹⁹ Les souris avec une induction de CUGBP1 8 fois supérieure à la normale ont présenté une altération des performances musculaires et une histologie très similaire à celle documentée chez les patients atteints de DM1.¹⁹ De plus, cette protéine joue un rôle fondamental dans l'expression du gène *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF α).²⁰ En effet, une étude a démontré que les souris présentant un mutant de *DPMK* avec 960 répétitions CUG dans les myoblastes interférait la fonction cytoplasmique de CUGBP1 entraînant une augmentation significative de TNF α dans les cellules musculaires.²⁰

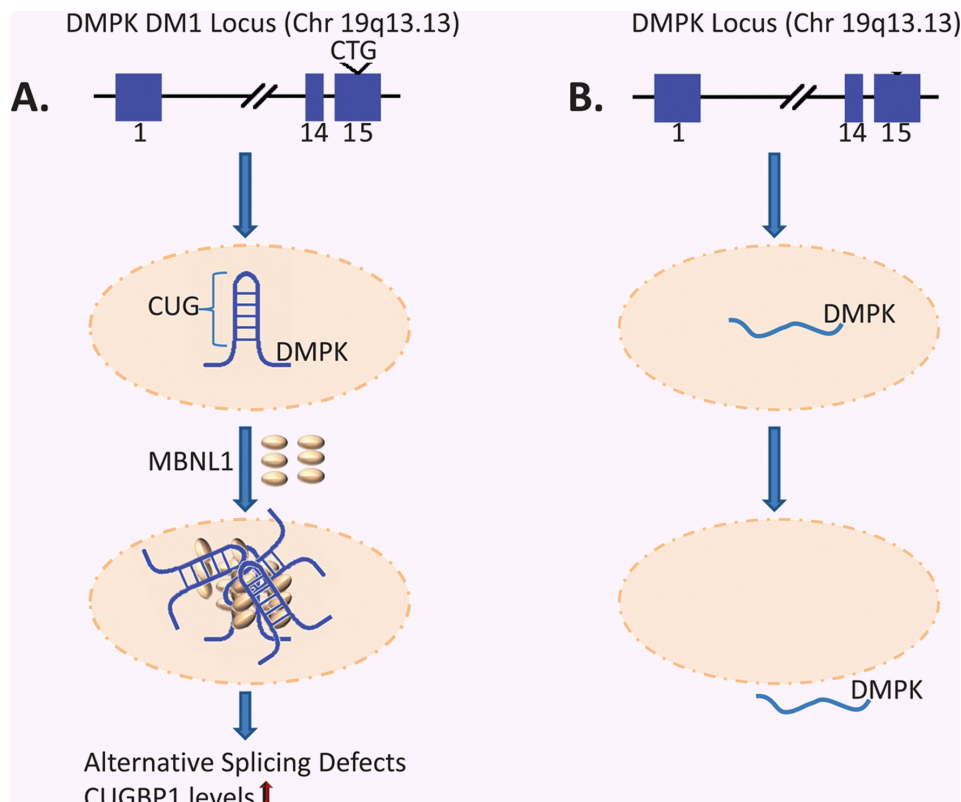


Figure 3. Protéines de liaison dérégulées en DM1 par les ARNm toxiques. (A) La transcription du gène *DPMK* entraîne la formation d'ARNm se structurant en épingle à cheveux en raison des longues répétitions CUG. La protéine MBNL1 se lie à ces ARNm entraînant des défauts d'épissages et une augmentation de CUGBP1. (B) Dans un contexte sain, les ARNm issus de la transcription du gène *DPMK* sont normaux et peuvent être exportés vers le cytoplasme. Tirée de Mastroiannopoulos *et al.*²¹

1.3.2 Halpainsuffisance du gène *DMPK*

D'autres mécanismes pathologiques liés aux répétitions CTG et au gène *DPMK* ont été avancés pour expliquer la pathophysiologie de la DM1. Parmi eux se trouve

l'haploinsuffisance, où une seule copie du gène est présente lors de la transcription.²² Ainsi, les personnes atteintes de DM1 ne sont porteuses que d'une seule copie du gène *DMPK* car l'autre copie présente des répétitions anormales et forment des foyers nucléaires.²² Ainsi la quantité de protéines disponibles pour la traduction est limitée.²² Par ailleurs, une étude a démontré que les souris portant une déplétion de *DMPK* ne reproduisent pas le phénotype multisystémique comme les patients atteints de DM1 et développent seulement une myopathie tardive.²² Ceci suggère que l'haploinsuffisance n'est pas le mécanisme entièrement responsable de l'origine de cette maladie.²²

1.3.3 Implication des gènes avoisinants du gène *DMPK*

Les répétitions en tandem présentes dans les copies des gènes ont des conséquences entre autres sur la structure de la chromatine. Elles entraînent sa condensation et ont un impact sur la transcription des gènes voisinant *DMPK*.²³ Une altération des gènes *Dytrophia Myotonica*, *WD Repeat Containing (DMWD)* et *SIX homeobox 5 (Six5)* également connu sous le nom de *DM adjacent homeobox protein (DMAHP)* a été mise en évidence. En DM1, ces gènes sont altérés et leur expression est diminuée.^{24 25} En effet, le gène *DMWD* présente une expression cytoplasmique significativement réduite entre 20 et 50% dans les lignées cellulaires DM1 en comparaison aux cellules saines.²⁵ Une diminution d'expression est également observée pour le gène *Six5*. Une étude a montré que l'expansion des répétitions a entraîné la diminution de l'expression de ce gène.²⁶ Les souris avec le gène *Six5* modifié (remplacement de son premier exon par un gène rapporteur) ont démontré une expression du gène rapporteur dans de nombreux tissus.²⁶ Les souris mutantes homozygotes n'ont pas présenté d'anomalie de leur fonction musculaire, mais ont développé des opacités lenticulaires. Ainsi, cette étude a montré que la déficience du gène *Six5* contribue au phénotype de la cataracte observée en dystrophie myotonique.²⁶ Une seconde étude a également mis en évidence l'impact du gène *Six5* sur les anomalies cardiaques retrouvées en DM1.²⁷ Des souris hétérozygotes avec une déficience du gène *Six5* et des souris de type sauvage ont été utilisées.²⁷ Puis, à l'aide de techniques d'échocardiographie, il a été montré que les souris hétérozygotes présentaient une augmentation de la taille du ventricule gauche ainsi qu'une anomalie dans la conduction infra-hisien (celui-ci permettant la contraction des cavités du cœur). Cette anomalie rejoint le phénotype retrouvé à l'âge adulte chez les patients atteints.²⁷

En résumé, les études récentes montrent que la DM1 est une maladie multisystémique causée par des répétitions anormales d'un trio de nucléotide au sein du gène *DMPK*. Les personnes atteintes de cette maladie présentent un muscle sévèrement altéré comme démontré par l'atrophie musculaire, la faiblesse musculaire ainsi que la myotonie qui constituent des signes cardinaux de la maladie. Ainsi, les prochains paragraphes seront consacrés à l'impact de cette maladie sur le muscle squelettique.

1.4 Description du muscle squelettique

Chez l'humain, il existe plusieurs types de muscles : le muscle lisse, le muscle cardiaque et enfin le muscle squelettique. Ce dernier type sera décrit de façon exhaustive dans le présent mémoire puisqu'il est directement en lien avec les objectifs de ma maîtrise. Le muscle squelettique représente entre 30 et 40% de la masse totale du corps et est l'acteur principal de nos mouvements. Il présente également plusieurs caractéristiques, notamment la contractilité, l'excitabilité et la plasticité. Elles vont respectivement permettre au muscle de se contracter, de répondre aux stimuli et de modifier sa structure.

1.5 Architecture du muscle squelettique

L'architecture du muscle squelettique est présentée à la Figure 4. Il est entouré d'une membrane de tissu conjonctif appelé épimysium et est composé de plusieurs faisceaux. Chacun de ceux-ci est entouré par une membrane appelée péri-mysium. Chaque faisceau est composé de plusieurs fibres musculaires se divisant elles-mêmes en myofibrilles. Les fibres musculaires sont formées d'une succession de sarcomères, lesquels sont composés de filaments d'actine et de myosine responsables de la contraction musculaire.^{28 29} Brièvement, le mécanisme de contraction implique un système complexe d'excitation : contraction lors de laquelle l'influx nerveux provoque la dépolarisation membranaire et l'ouverture de canaux calciques menant à la contraction musculaire.²⁹ Les fibres musculaires sont entourées de la lame basale et entre celle-ci et le sarcolemme, sont retrouvées les cellules souches musculaires (CSM) également appelées cellules satellites.^{30 31} Ces cellules satellites jouent un rôle crucial dans le développement et la réparation musculaire. Elles sont différentes de celles retrouvées en périphérie des fibres musculaires, lesquelles sont multinucléées, post-mitotiques et ne participent donc pas aux

processus de développement et de réparation du muscle.^{30 31} Leur rôle étant central dans le présent mémoire, les cellules satellites seront décrites dans le détail à la section 1.7.

Au sein du muscle squelettique, deux types de fibres musculaires sont présents en proportion variable et se distinguent sur plusieurs points.³² Les fibres musculaires de type I participent aux contractions lentes tandis que les fibres de type 2 sont responsables des contractions rapides.³² Les fibres de types 1 seront généralement retrouvées dans des muscles dépendants du métabolisme oxydatif et sont connues comme étant résistantes à la fatigue.³² Les fibres de type 2 sont quant à elles retrouvées au sein des muscles dépendant du métabolisme glycolytique.³² Ainsi, la proportion de ces deux types de fibres varie selon les tissus et les individus.

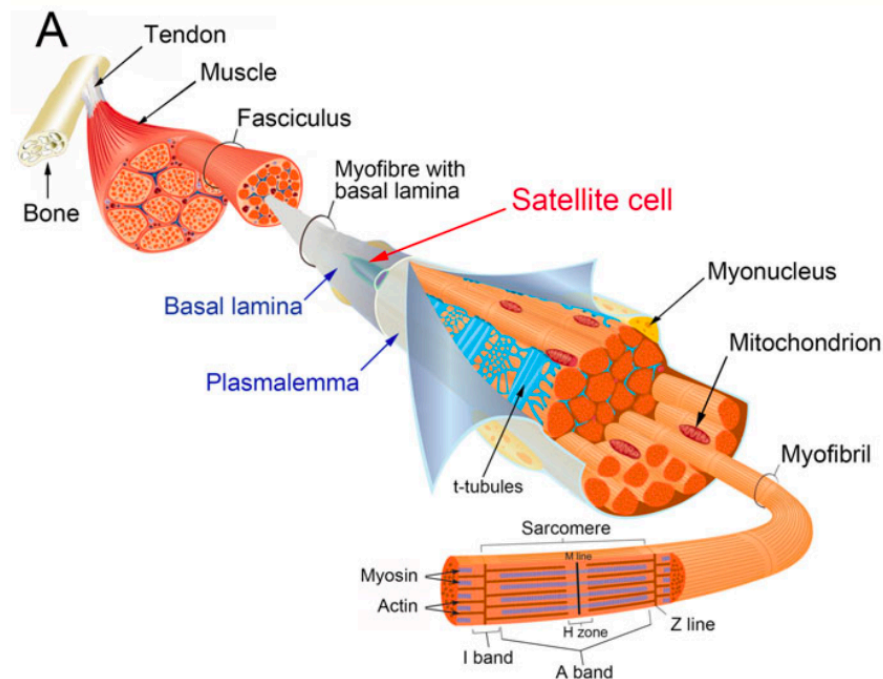


Figure 4. Architecture du muscle squelettique³⁰. Structure hautement hiérarchique du muscle squelettique et représentation de la position des CSM se trouvant sous la lame basale. Tirée de Relaix, F. *et al.*³⁰

1.6 Homéostasie musculaire

L'homéostasie du tissu musculaire dépend de l'équilibre entre la dégradation et la synthèse des protéines. Certaines voies de signalisation favorisent la dégradation des protéines musculaires telles que le système ubiquitine-protéasome. Celui-ci implique des facteurs de transcription comme le Forkhead box protein O-1 (FoxO-1) /Forkhead box

protein O-3 (FoxO-3) /atrogin-1/Muscle ring finger protein 1 (MuRF1). Alors que d'autres voies telles que Phosphoinositide-3-kinase (PI3K)/Protéine kinase B (Akt)/Mechanistic target of rapamycin (mTOR) favorisent la synthèse des protéines.³³ En situation basale, cet équilibre est finement régulé et les taux de dégradation et de synthèse protéiques sont équivalents, ce qui mène à une stabilité dans la masse musculaire. Toutefois, le muscle est très sensible à son environnement et cet équilibre est influencé par de nombreux facteurs tels que les hormones, les maladies, l'immobilisation ou l'application de stimuli externes.³⁴ Par exemple, une atrophie musculaire est observée dans des conditions de déconditionnement (ex : alitement prolongé), ou dans certaines maladies, telle que la maladie pulmonaire obstructive chronique où les patients atteints présentent une expression plus élevée des protéines d'atrogin-1, FoxO-1 et et muRF1.³⁵ À l'inverse, une hypertrophie musculaire est induite par un entraînement en force. En effet, l'exercice entraîne une augmentation de la synthèse des protéines musculaires via l'activation de la signalisation de la voie Akt/mTOR.³⁶ Plusieurs facteurs de croissance jouent un rôle dans cet équilibre synthèse/dégradation, notamment le facteur de croissance Insulin-like growth hormone 1 (IGF-1), qui est impliqué dans la différenciation et la prolifération des myoblastes.³⁷ Il permet également d'activer la voie PI3K/Akt/mTOR.³⁷ Ainsi, une surexpression de IGF-1 entraîne une hypertrophie musculaire et augmente la synthèse des protéines. À l'inverse, l'inhibition d'IGF-1 bloque la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR et entraîne donc une atrophie.³⁷ Une étude a démontré que les souris déficientes en IGF-1 présentent alors une masse musculaire faible, réduite ainsi qu'un retard de croissance.³⁶⁻³⁹ Par ailleurs, une diminution de l'expression d'IGF1 peut potentiellement être liée à l'ampleur des répétitions CTG en DM1 et donc être en partie responsable de l'haplo-insuffisance de *DMPK*. Ceci en bloquant le transfert de l'ARNm de *DMPK* vers le cytoplasme.⁴⁰ Ceci entraîne alors une diminution de l'insuline disponible mais également une diminution de l'expression des récepteurs à l'insuline. Le niveau d'IGF-1 est donc faible chez les personnes atteintes de DM1 alors que cette hormone est essentielle pour le contrôle de la masse musculaire.⁴⁰

Une seconde étude a mis en évidence le rôle du facteur de croissance fibroblast growth factor (FGF) dédiée aux fibroblastes, dans la croissance musculaire. En effet, lorsque ce facteur n'est plus présent, la masse squelettique diminue et l'organisation des myofibres devient anormale.⁴¹ De plus, la protéine nuclear factor kappa B (NF-κB) se trouvant dans le noyau est impliquée dans la régulation de l'atrophie. Cette dernière influence

positivement la cytokine TNF α dans son inhibition de la différenciation musculaire. La surexpression de NF- κ B contribue donc à une atrophie sévère⁴². En DM1, les patients présentent des niveaux anormalement élevés dans le sang suggérant que cette cytokine pourrait être en partie responsable de l'atrophie en DM1 via l'inhibition de la différenciation.^{43,44}

Comme énoncé plus haut, les cellules satellites jouent un rôle clé dans le développement et la réparation musculaire. En DM1, la fonction de ces cellules est affectée. Les prochains paragraphes seront donc dédiés à leur description, mais également à leurs atteintes en DM1.

1.7 Myogenèse et cellules satellites

Les cellules souches musculaire (CSM) ou cellules satellites ont été décrites pour la première fois par Mauro en 1961 comme des cellules résidant dans une niche située entre le sarcolemme et la lame basale.⁴⁵ Les CSM ou les cellules satellites peuvent donner différents types cellulaires via leur potentiel de multipotence notamment des ostéocytes ou des adipocytes mais ces dernières produisent majoritairement les cellules précurseurs myogéniques ou myoblastes.^{46 47} Ces cellules vont donc répondre à des stimuli, leur permettant de proliférer, puis se différencier et fusionner afin de former des fibres musculaires.⁴⁶ Ces CSM participent à l'homéostasie cellulaire, mais également à la réparation du muscle blessé via le processus de myogenèse.⁴⁵ Comme présenté à la Figure 5, les cellules sont tout d'abord quiescentes, mais suite à une lésion, elles sont activées par différents facteurs présents dans l'environnement. Brièvement, lors du processus myogénique, les cellules satellites deviennent des myoblastes qui prolifèrent avant de se différencier et de fusionner afin de former des myotubes puis des myofibres. Pour chaque étape de ce processus de myogenèse, il y a l'intervention de facteurs de transcription très spécifiques. Certains de ces facteurs de transcription permettent aux cellules de conserver leur statut quiescent alors que d'autres jouent un rôle dans l'activation, la prolifération, la différenciation, la fusion ainsi que dans l'autorenouveaulement des cellules satellites.⁴⁸ De façon plus précise, lorsque les cellules sont quiescentes, elles expriment le facteur de transcription paired protein box 7 (Pax7). Ce facteur est essentiel à la survie des cellules satellites.^{49,50} Une étude a démontré que les souris déficientes en Pax-7 sont totalement dépourvues de cellules satellites dans le muscle squelettique.⁴⁹ Ainsi le muscle

squelettique ne se développe pas et les souris présentent une démarche anormale ainsi qu'un poids plus faible en comparaison aux souris témoins.⁵⁰ Celles-ci finissent alors par mourir dans les deux semaines suivant la naissance.⁴⁹ De plus, les cellules satellites quiescentes expriment de façon majoritaire le facteur de transcription myogenic factor 5 (Myf5).⁵¹ Cependant, une sous-population de cellules satellites (environ 10% des cellules Pax7+) n'expriment pas Myf5 et ces cellules sont considérées comme possédant un potentiel de renouvellement du pool des CSM plus important.⁵² Lorsque les cellules satellites sont activées, elles prennent alors le nom de myoblastes ou cellules précurseurs myogéniques. À ce stade, ce sont les facteurs de transcription MyoD1 et Myf5 qui sont exprimés. Lorsque ces cellules commencent à différencier, Pax7 n'est plus exprimé par les cellules satellites et lorsque celles-ci débutent leur différenciation, elles commencent à exprimer le facteur de transcription Myogénine (MyoG).⁴⁸ Ce facteur est indispensable à la différenciation des cellules satellites. En effet, une étude réalisée chez des poissons-zèbres mutants en MyoG a permis de montrer que sans ce facteur, les poissons-zèbres présentaient une réduction de la croissance des myofibres en raison des difficultés de différenciation des cellules satellites et présentaient conséquemment une fusion réduite. Aussi, le nombre de noyaux associés aux myofibres était réduit.⁵³

Les CSM présentent une fonction altérée en DM1. En effet, celles-ci présentent une capacité de prolifération réduite due à un profil de sénescence précoce entraînant un défaut de réparation et du maintien de la masse musculaire.^{28 54} De plus, il a été démontré que les répétitions CTG ont un impact sur la myogenèse et que même chez les phénotypes les moins sévères, la différenciation et la fusion des CSM de souris sont significativement diminuées.^{55 56} De plus, les répétitions CTG anormalement élevées sur le gène *DMPK* sont associées à un retard de maturation des CSM en DM1.⁵⁷

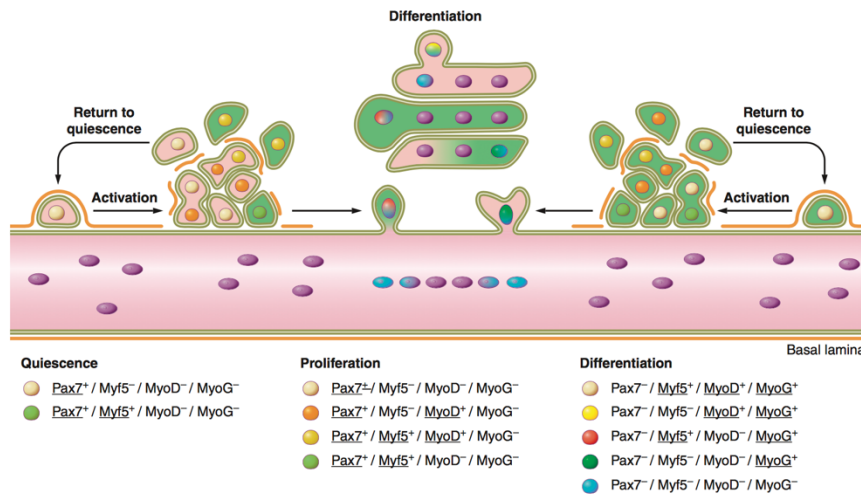


Figure 5. Illustration des étapes du processus myogénique et des facteurs de transcription impliqués.⁴⁸ Les facteurs de transcriptions jouent chacun un rôle dans des étapes précises de la myogenèse permettant aux CSM de proliférer, se différencier et fusionner. Tirée de Yin, H. *et al.*⁴⁸

En plus de ces déficiences musculaires et cellulaires, il est possible qu'un environnement inflammatoire soit présent dans le muscle DM1. Celui-ci pourrait être en partie responsable des atteintes retrouvées dans le muscle. Ainsi, les prochains paragraphes vont aborder l'inflammation dans un contexte de muscle sain puis dans un contexte de dystrophie musculaire.

1.8 Inflammation

L'inflammation sera décrite dans les paragraphes ci-dessous dans un contexte de muscle sain puis dans un contexte de dystrophie musculaire.

1.8.1 Inflammation dans un contexte de muscle sain

Suite à une blessure, un processus inflammatoire est typiquement déclenché par le bris vasculaire accompagnant la blessure musculaire. Ainsi, à ce moment, il y a activation des mécanismes de l'hémostase primaire et secondaire, entraînant respectivement la formation de clou plaquettaire et l'activation d'une cascade de coagulation formant un caillot. Cependant, il a été démontré que d'autres molécules pouvaient participer au déclenchement du processus inflammatoire, dont les damage-associated molecular patterns (DAMPs). Ces molécules sont libérées par le tissu blessé et permettent d'activer les mastocytes et macrophages présents.⁵⁸ Ces derniers vont favoriser la production de

médiateurs pro-inflammatoires stimulant l'activation et la prolifération des cellules satellites.⁵⁸

Au début de la phase inflammatoire, certains types cellulaires tels que les neutrophiles et les monocytes sanguins infiltrent le tissu blessé et y libèrent des cytokines pro-inflammatoires.⁵⁹ Comme présenté à la Figure 6, les neutrophiles sont les premières cellules à arriver au site blessé et elles participent à la dégradation du tissu musculaire endommagé.⁶⁰ Par la suite et par chimiotactisme, ce sont les monocytes qui sont recrutés à partir du sang et qui se différencient en macrophages lors de leur migration dans le tissu blessé.⁵⁸ Ces macrophages sont dits pro-inflammatoires et sont nommés macrophages M1. Ils produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'interféron gamma (IFN γ) ou l'interleukine 6 (IL6) etc.⁶¹ Les macrophages M1 expriment fortement les antigènes CD86 et CD80 à leur surface et jouent un rôle important dans la phagocytose. En effet, ils permettent l'élimination des neutrophiles apoptotiques, des agents pathogènes et des débris cellulaires.⁶¹ Par la suite, ces macrophages M1 changent de phénotype pour devenir des macrophages anti-inflammatoires surnommés M2. Ceux-ci présentent à leur surface l'antigène CD163 et produisent principalement des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL10 ou l'IL4. Ainsi, ils participent activement à la résolution de l'inflammation.⁶² Les macrophages M2 sont activés par les interleukines 4 (IL4), 10 (IL10) et 13 (IL13), lesquelles sont produites par les neutrophiles.^{61,62} Ces deux types de macrophages diffèrent sur plusieurs points. Premièrement, les macrophages M1 et M2 agissent de manière différente sur les cellules satellites. Une étude *in vitro* et *in vivo* a permis de démontrer que les macrophages pro-inflammatoires M1 inhibent la fusion des cellules satellites tandis que les macrophages M2 favorisent leur différenciation en myotubes.⁶³ De plus, suite à une lésion, une évolution dans l'expression des marqueurs myogéniques et des macrophages a été observée. Cette étude a montré que les zones de réparation contenant des macrophages en prolifération étaient associées à des macrophages exprimant des marqueurs pro-inflammatoires tandis que dans les zones de réparation les cellules précurseurs myogéniques différenciées étaient associées à des macrophages exprimant des marqueurs anti-inflammatoires.⁶³

La polarisation des macrophages (phénotype M1/M2) joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie et la réparation du muscle. La polarisation est un processus par lequel les macrophages se distinguent via des réactions à des stimuli et à des signaux

de façon très spécifique.⁶⁴ Ainsi les macrophages peuvent être polarisés soit en macrophage M1 ou en M2 représentant respectivement les opposés du continuum de macrophages. L'utilisation des nomenclatures simplifiées M1 et M2 est utilisée afin de comprendre plus facilement le rôle de ces cellules, mais il est connu qu'il existe un large spectre de phénotypes entre ces deux pôles.⁶⁴

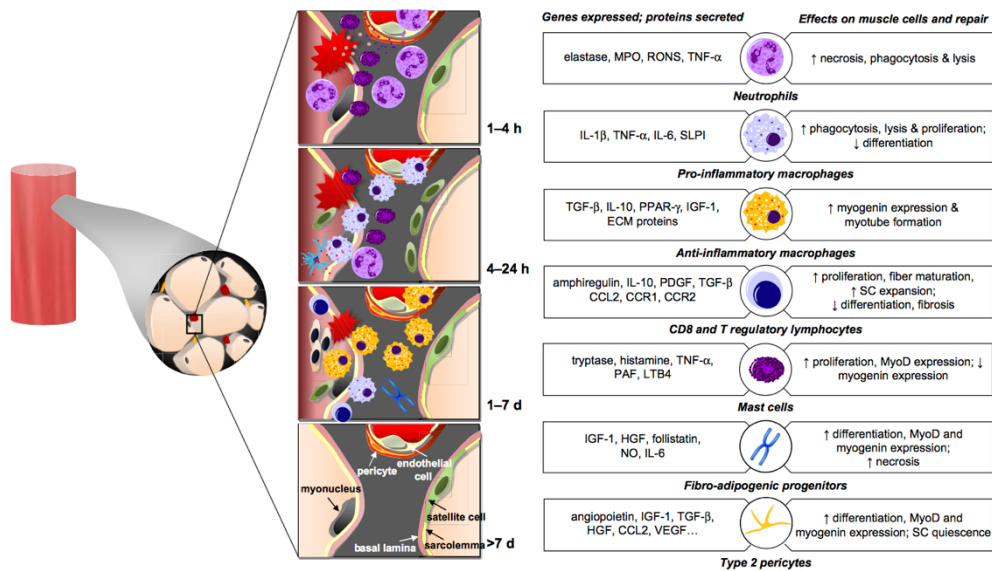


Figure 6. Illustration des différents types de cellules impliquées dans la réparation du muscle à la suite d'une blessure.⁶⁵ Les cellules immunitaires interviennent selon une temporalité et une durée précise pour une réparation musculaire efficace. Tirée de Peake, J. M. *et al.*⁶⁵

1.8.2 Inflammation dans un contexte de dystrophie musculaire

Des études récentes ont mis en évidence la présence d'un processus inflammatoire dans un contexte de dystrophie musculaire où certaines cellules impliquées dans la réparation du muscle comme les macrophages en seraient la cause. Comme présenté à la Figure 7, dans un contexte de muscle sain, les macrophages M1 pro-inflammatoires demeurent quelques jours dans le muscle après une lésion.⁶⁶ Cependant, dans le cadre d'un muscle dystrophique, tel que retrouvé en dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), ces macrophages pro-inflammatoires persistent dans le temps entraînant une inflammation chronique.⁵⁸ Par ailleurs, les travaux d'une étude ont démontré un chevauchement de la signalisation de TNF α , présent normalement lors de la phase inflammatoire, et de transforming growth factor beta 1 (TGF β -1) normalement présent pendant la résolution

de l'inflammation.⁶⁷ Ainsi, les macrophages exprimaient à la fois TNF α et TGF β -1 alors qu'une succession temporelle précise est normalement cruciale pour assurer une réparation musculaire efficace.⁶⁷ Le chevauchement de ces signaux dans un contexte d'inflammation chronique et dans les dystrophies musculaires entraîne ainsi un processus inflammatoire asynchrone, et subséquemment, un dérèglement des activités des CSM.^{58,}
66

En DM1, les études ont mis en évidence la présence d'un processus inflammatoire au niveau systémique. En effet, une étude a permis de comparer 18 hommes atteints de DM1 avec 18 témoins en comparant les taux sanguins de cytokines TNF α et IL6.⁶⁸ Les résultats ont démontré que les niveaux d'IL6 et TNF α étaient significativement plus élevés chez les patients atteints.⁶⁸ Les résultats d'une seconde étude comparant 56 patients DM1 à 28 sujets sains ont permis de démontrer que les sérums des patients DM1 étaient significativement plus riches en TNF α et d'IL6.⁴⁴ De plus, les niveaux de TNF α étaient directement corrélés à la taille de l'expansion CTG ; plus le nombre de répétitions était élevé, plus le taux sérique de TNF α était augmenté.⁴⁴ Ainsi, ces études soutiennent l'hypothèse de la présence d'un processus inflammatoire au niveau systémique en DM1.

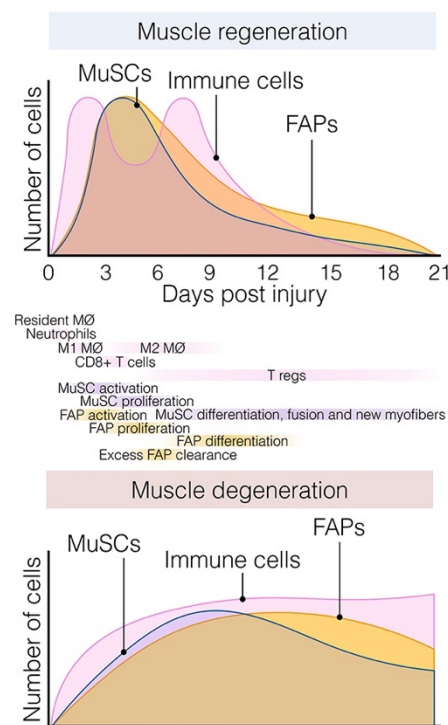


Figure 7. Déroulement temporel de la présence des cellules immunitaires après une lésion. Contexte de muscle sain (photo du haut) en comparaison à un contexte de dystrophie musculaire de Duchenne (photo du bas). FAPs : Fibro adipogenic progenitors Tirée de Yao, Y *et al.*⁶³

Les médiateurs lipidiques occupent une place centrale au sein de ce projet en raison de leur rôle documenté dans la résolution de l'inflammation chez certaines dystrophies musculaires et autres maladies. Les paragraphes suivants décrivent ces molécules, leur mode action ainsi que leur implication dans différentes maladies.

1.9 Description des médiateurs lipidiques

Comme présenté dans le chapitre précédent, différents acteurs sont impliqués dans le processus inflammatoire. Les lipides endogènes sont quant à eux impliqués dans toutes les phases de l'inflammation en jouant un rôle dans la régulation immunitaire et dans le maintien de l'homéostasie tissulaire.^{69, 70} Ces lipides sont exprimés dans les membranes de toutes les cellules et participent donc aux interactions intermembranaires et à la signalisation cellulaire.⁷¹ Parmi ces lipides, deux catégories se distinguent par leurs rôles et leur moment d'action dans l'inflammation, soit les médiateurs lipidiques pro-inflammatoires et les médiateurs pro-résolution. Pendant la phase de l'inflammation, plusieurs molécules sont produites à partir de ces acides gras et plus particulièrement à partir de l'acide arachidonique, un acide gras de la famille des omégas 6. Ce sont par le biais d'enzymes, telles que les cyclooxygénases ou les lipoxygénases, qui dégradent l'acide arachidonique, que ces médiateurs sont produits.^{72 73} (Figure 8) . L'enzyme lipoxygénase-5 (LOX5) permet de cliver l'acide arachidonique pour donner la famille des leucotriènes alors que les cyclooxygénases 1 (COX1) ou 2 (COX2) permettent la formation des prostaglandines notamment la prostaglandine E2 (PGE2).⁷² Celle-ci joue un rôle dans la régulation du flux sanguin et la perméabilité vasculaire.⁷² Ces eicosanoïdes attirent, par chimiotactisme, des neutrophiles afin d'éliminer les agents pathogènes.⁷⁴ L'augmentation de l'expression des isoformes des enzymes LOX5 et LOX15 entraîne, par clivage de l'acide arachidonique, la production de lipoxines, médiateurs de résolution de l'inflammation.⁷⁵ Ce changement de classe des médiateurs lipidiques marque donc le début de la phase de résolution de l'inflammation, notamment par le passage des éicosanoïdes aux lipoxines, lesquelles constituent incidemment une famille des médiateurs de la résolution de l'inflammation.⁷⁵ En plus des lipoxines, les exsudats de résolution présentent des molécules issues d'oméga 3, tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), lesquels génèrent plusieurs familles de médiateurs. Premièrement, la famille des résolvines E est obtenue par clivage de l'EPA

par l'enzyme LOX-5. La famille des protectines et des résolvines est obtenue via l'action de l'enzyme LOX-15 sur le DHA. Parmi la famille des résolvines, nous retrouvons des sous-catégories telles que les résolvines D1 (RvD1) et les résolvines D2 (RvD2). Celles-ci se distinguent premièrement par leur nomenclature chimique, mais aussi par les récepteurs via lesquelles elles s'activent. Enfin, les marésines sont obtenues par clivage du DHA par les enzymes LOX12 et LOX15 et parmi elles, sont retrouvées les marésines 1 (MR1) et les marésines 2 (MR2). L'ensemble de ces molécules constituent des familles de médiateurs agissant au cours de la phase de résolution de l'inflammation.⁷⁶

Le mécanisme d'action de ces molécules est actif lorsqu'elles se lient à leur récepteur respectif.⁷⁷ Par exemple, les lipoxines sont activées lorsqu'elles sont liées aux récepteurs Formyl peptide Receptor 2 (FPR2) et protein-coupled receptor 32 (GPR32) et permettent de diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires.⁷⁸ Également, la famille des résolvines vont se lier à des récepteurs spécifiques couplés à des protéines G, appelés GPCR (G protein coupled receptors).⁷⁷ Les RvD1 et RvD2 sont activées par des récepteurs distincts. La résolvine D1 est activée lorsqu'elle se lie aux récepteurs FPR2 et GPR32 et peut donc agir dans la résolution de l'inflammation. Les actions de la RvD1 via le récepteur GRP32 ont déjà été démontrées sur les macrophages.⁷⁸ En effet, lorsque ce récepteur est supprimé par le biais d'ARN interférent, la polarisation des macrophages vers un phénotype prorésolution est bloquée. La RvD2 s'active quant à elle via le récepteur GPR18 et est devenue un candidat potentiel au sein des maladies dystrophiques et cardiovasculaires. En effet, lorsque celle-ci est activée par ce récepteur, la polarisation des macrophages vers un profil M2 est stimulée et donc induit une diminution de l'inflammation.⁷⁸

Les résolvines, les protectines et les lipoxines stimulent également le processus d'efférocytose (élimination des cellules apoptotiques par les phagocytes)⁷⁹ afin de restaurer l'homéostasie. Cependant, l'inflammation n'est pas dans tous les cas résolue et ceci conduit alors à une inflammation chronique ou une fibrose, dues à des concentrations élevées de prostaglandines et de leucotriènes. Néanmoins, les résolvines ont la capacité de limiter cet effet puisqu'elles favorisent la phagocytose des cellules et déchets cellulaires au niveau des tissus inflammés.^{80,81}

seringue et les PMN se sont tous déplacés le long du gradient de l'IL8 de façon proportionnelle au temps. Ensuite, la RvD1 a été infusée via une seconde seringue dans la chambre puis immédiatement les neutrophiles ont arrêté de suivre le gradient de l'IL8. Ceci montre que la RvD1 a permis de contrôler l'infiltration excessive des neutrophiles et donc de favoriser la résolution de l'inflammation.⁸³

Une étude a été menée chez des souris transgéniques appelées *fat-1* reproduisant l'inflammation chronique retrouvée dans la colite ulcéreuse.⁸⁴ Ces dernières ont la capacité de convertir de manière endogène leurs acides gras oméga 6 en oméga 3 entraînant une production élevée de résolvines qui est associée à une diminution significative des marqueurs inflammatoires tels que TNF α , IL1b et de la voie NF- κ B.⁸⁴

1.10.2 Action des médiateurs lipidiques dans le muscle

Plusieurs études démontrent l'impact des médiateurs lipidiques sur le muscle. Premièrement, une étude a étudié l'effet de la RvD1 à la suite d'une lésion musculaire induite par une injection intramusculaire de Barium Chloride (BaCl₂) dans un modèle murin.⁸⁵ Les résultats de cette étude montrent que le traitement à la RvD1 a permis de diminuer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.⁸⁵ De plus, les souris blessées, non traitées, présentaient un espace interstitiel et donc non contractile entre les myofibres plus grand que les souris traitées à la RvD1. Ces résultats suggèrent que la RvD1 a réduit cet espace non contractile et a stimulé la récupération de la force musculaire. Cette même équipe de recherche a également démontré, dans une autre étude, que l'injection de RvD1 chez les souris blessées permettait non seulement d'atténuer l'accumulation de macrophages pro-inflammatoires, mais également de réduire l'expression de l'ARNm de cytokines inflammatoires tel que l'IL6 ou TNF α .⁸⁶ L'effet de la RvD1 sur les macrophages a montré que le médiateur stimule la phagocytose des macrophages M1 et induit la conversion des macrophages vers un phénotype proche du phénotype pro-résolution des macrophages M2. De plus, il a été démontré *in vitro* que le traitement à la RvD1 a permis de stimuler la fusion des cellules satellites et ainsi augmenter la taille des myotubes fusionnés.⁸⁶

Enfin, une étude récente a permis d'étudier l'action de la RvD2 dans un contexte de dystrophie musculaire et plus particulièrement la DMD.⁸⁷ Cette étude a démontré que la RvD2 augmente la proportion de myoblastes différenciés après le traitement permettant de mettre en évidence l'effet de la RvD2 sur la myogenèse.⁸⁷ Cette étude a également démontré que Gpr18, le récepteur de la RvD2, est plus exprimé lors de la différenciation des cellules satellites. La délétion de ce récepteur (modèle knockout) a limité l'effet de la RvD2 à stimuler la différenciation et la fusion des cellules satellites démontrant alors que ce médiateur peut stimuler la myogenèse, mais seulement par le biais de son récepteur gpr18.⁸⁷

1.10.3 Implications des médiateurs lipidiques dans d'autres maladies

L'implication et l'effet positif des médiateurs lipidiques ont été étudiés dans de nombreuses pathologies.^{88 89} Il a été démontré que ces molécules jouent un rôle dans la résolution de l'inflammation dans plusieurs maladies inflammatoires, notamment la colite, mais également dans plusieurs maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer. De plus, les médiateurs ont démontré leur efficacité dans des maladies infectieuses, notamment la maladie parodontale ou dans certaines maladies causées par l'infection de *E. coli* où les médiateurs ont permis de stimuler la phagocytose des bactéries. Ces molécules ont également été démontrées comme étant efficaces lors d'infections oculaires provoquées par exemple par le virus de l'herpès où les médiateurs ont permis d'empêcher la réplication du virus. Ainsi, les médiateurs lipidiques agissent sur un panel de maladies dont quelques exemples seront présentés dans les sections suivantes.

Une première étude a permis de démontrer l'action de la lipoxine A4 (LXA4) dans l'inflammation pulmonaire chez un modèle murin.⁹⁰ Cette inflammation pulmonaire a été induite chez les souris par aérosol. Après avoir injecté la LXA4 chez ces souris, une réduction significative de l'infiltration des leucocytes a été constatée, mais également une diminution de l'inflammation notamment par l'intermédiaire de la diminution de l'IL5 et l'IL13.⁹⁰

Une seconde étude a mis en évidence l'action de la RvE1, un médiateur lipidique anti-inflammatoire dérivant de l'EPA.⁹¹ L'administration d'EPA dans un modèle murin atteint de péritonites (inflammation aiguë) a engendré la synthèse de RvE1 dans les exsudats. C'est également au sein de la colite (inflammation du colon) que la résolvine a pu démontrer son efficacité sur l'inflammation en réduisant l'expression des gènes pro-inflammatoires tels que l'IL12 ou TNF α mesurés par RT-qPCR.⁹¹

La RvD1 ainsi que la PD1 sont deux catégories de médiateurs issues également de l'acide gras oméga 3 considérés comme étant des médiateurs naturels prorésolution.⁹² Ces deux médiateurs ont prouvé leur efficacité contre les lésions rénales aiguës. Le traitement à la RvD1 et à la PD1 chez les souris en prophylaxie de la lésion par ischémie a permis de réduire les lésions fonctionnelles et morphologiques aux reins. La fibrose interstitielle a également été réduite après le traitement et les deux médiateurs ont réduit le nombre de leucocytes et l'activation de macrophages pro-inflammatoires.⁹²

La découverte des familles des médiateurs lipidiques pro-résolution offre donc une nouvelle voie et une nouvelle opportunité pour le développement de nouveaux traitements contre les maladies inflammatoires.

1.11 Problématique de recherche

Comme énoncé précédemment, le muscle squelettique et la fonction des cellules souches musculaires (CSM) sont grandement affectés dans la DM1. À l'inverse de certains autres types de dystrophies musculaires, où la présence d'un processus inflammatoire chronique local et systémique est mieux documentée, la caractérisation de l'inflammation en DM1 est encore peu connue. En effet, seuls des niveaux élevés de certaines cytokines pro-inflammatoires ont été mesurés au niveau systémique. En DM1, il a été démontré qu'un profil inflammatoire anormalement élevé pouvait contribuer à l'atrophie musculaire. Il paraît donc nécessaire de caractériser finement l'inflammation au niveau local et systémique mais également de proposer des traitements visant à l'atténuer. Un traitement basé sur l'utilisation de médiateurs lipidiques ayant déjà été démontré comme étant efficace pour diminuer l'inflammation et améliorer la fonction des CSM dans d'autres dystrophies dont la dystrophie musculaire de Duchenne semble être une avenue thérapeutique intéressante pour limiter les déficiences musculaires en DM1. C'est pour

cela que plusieurs objectifs ont été établis, le plus général étant d'améliorer les connaissances relatives à l'inflammation locale et systémique en DM1 et de démontrer l'efficacité des médiateurs lipidiques à diminuer l'inflammation et à améliorer la fonction des CSM en DM1.

Chapitre 2 - Objectifs et hypothèses

2.1 Objectifs

L'objectif général de ce travail était de démontrer l'efficacité des médiateurs lipidiques à diminuer l'inflammation et à améliorer la fonction des CSM en DM1. Plusieurs médiateurs lipidiques pro-résolution de l'inflammation ont été testés notamment ceux appartenant à la famille des lipoxines, des résolvines, des protectines et des marésines. Cependant, seulement les médiateurs ayant généré les données préliminaires les plus prometteuses ont été conservés pour l'ensemble des expériences présentées dans ce mémoire.

Les objectifs spécifiques étaient de :

- Caractériser la corrélation entre la perte de la force musculaire des patients atteints de DM1 et l'inflammation systémique mesurée dans le sang
- Caractériser le profil inflammatoire et les atteintes fonctionnelles des CSM issues de patients DM1.
- Démontrer l'efficacité de certains médiateurs lipidiques pro-résolution à diminuer l'inflammation tissulaire (muscle) et cellulaire (CSM)
- Démontrer l'efficacité de certains médiateurs lipidiques pro-résolution à améliorer la fonction myogénique des CSM (prolifération, différenciation et fusion) en DM1.

2.2 Hypothèses

Les hypothèses suivantes ont donc été établies pour répondre aux objectifs spécifiques du projet :

- Les individus atteints de DM1 et avec une inflammation systémique élevée présente une diminution de force musculaire
- Les CSM issues de patients DM1 ont un profil inflammatoire élevée entraînant une altération de leurs fonctions
- Le traitement des CSM avec certains médiateurs lipidiques pro-résolution entraînera une diminution de l'inflammation tissulaire et cellulaire
- Le traitement des CSM avec certains médiateurs lipidiques pro-résolution améliorera la fonction myogénique des CSM.

Chapitre 3 - Méthodologie, résultats et discussion

Article de recherche qui sera soumis au journal *Skeletal Muscle* en avril 2022.

Targeting muscle stem cells as a therapeutic approach to mitigate myotonic dystrophy type 1

Mokhtari Inès^{1,2,3,4}, Conte Talita^{4,6}, Marie-Pier Roussel^{2,3,5}, Ornella Pellerito⁴, Dumont Nicolas⁷, Duchesne Elise^{1,2,3}

1. Département des sciences de la santé, Université du Québec à Chicoutimi, Québec, Canada
2. Groupe de recherche interdisciplinaire sur les maladies neuromusculaires (GRIMN), Centre intégré universitaire de santé et de services sociaux du Saguenay–Lac-Saint-Jean, Hôpital de Jonquière, Québec, Canada
3. Centre intersectoriel en santé durable (CISD), Université du Québec à Chicoutimi, Québec, Canada
4. Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada
5. Département des sciences fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, Québec, Canada
6. Département de pharmacologie et de physiologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada
7. École de réhabilitation, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada

*** Corresponding author:**

Elise Duchesne, pht, Ph.D

Unité d'enseignement en physiothérapie, Département des sciences de la santé, Université du Québec à Chicoutimi

555, boul. de l'Université Chicoutimi, Québec, Canada G7H 2B1

Office: 418-545-5011 (#6148); Fax: 418-545-5012

E-mail: elise1_duchesne@uqac.ca

ORCID ID:

Elise Duchesne: 0000-0002-9953-8315

3.1 RÉSUMÉ

Introduction : La dystrophie myotonique de type 1 (DM1) représente la myopathie la plus fréquente chez l'adulte. Les personnes atteintes de DM1 présentent une faiblesse et une atrophie musculaire. Les cellules souches musculaires (CSM) sont également affectées dans cette maladie. Ces dernières présentent une sénescence prématurée et une diminution de leur capacité à proliférer et à se différencier. En plus de cela, il a été démontré que les personnes atteintes de DM1 présentent un profil inflammatoire sérique. Actuellement, il n'existe pas de traitement en DM1. Cependant, plusieurs études démontrent l'efficacité de nouvelles molécules appelées médiateurs lipidiques pour cibler la fonction des CSM et l'inflammation. Parmi ces molécules, la marésine 2 (MR2), les résolvines D1 (RvD1) et D2 (RvD2) ont démontré dans des études leur rôle actif dans la résolution de l'inflammation. Cependant, leur potentiel thérapeutique pour le traitement des maladies musculaires reste inconnu. Objectifs : 1) Déterminer le profil inflammatoire dans les tissus musculaires et les CSM issues de biopsies de personnes atteintes de DM1 en comparaison à celui retrouvé chez des individus sains, 2) Évaluer l'effet des médiateurs lipidiques sur la fonction des CSM en DM1. Méthodologie : Des tissus musculaires et des CSM ont été obtenus à partir de patients DM1 (n=8, 6 femmes et 2 hommes) et de sujets sains (n=4, 2 femmes et 2 hommes). L'expression des gènes inflammatoires a été mesurée par séquençage de cellules uniques et la quantification des macrophages a été évaluée sur les coupes de tissus. L'impact des médiateurs lipidiques sur la fonction des CSM et sur l'expression des gènes inflammatoires a été évalué par immunofluorescence et RT- qPCR, respectivement et analysé par des tests-t pour échantillons indépendants. Résultats : Les macrophages et plusieurs gènes de l'inflammation tels que CXCL1, IL1a, IL1b, IL6 et CXCL8 sont surexprimés chez les sujets DM1 par rapport aux sujets sains. La RvD2 a significativement augmenté la prolifération. Puis, la MR2 et la RvD2 ont significativement stimulé la différenciation des CSM dans les cellules DM1. Enfin, la RvD1, RvD2 et la MR2 ont induit une diminution des gènes de l'inflammation tels que TNFa, IL1 ou IL6. Conclusion : Ce projet apporte un nouvel espoir de cibler les atteintes observées en DM1 en particulier l'inflammation et la fonction des CSM afin de limiter les atteintes musculaires présentes en DM1.

3.2 ABSTRACT

Background: Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is the most frequent myopathy in adults. Individuals with DM1 are characterized by muscle weakness and atrophy. Also, muscle stem cells (MSC) are affected in this disease. They exhibit premature senescence and decreased capacity of proliferation and differentiation. In addition, this disease is associated with an elevated serum inflammatory profile. Currently, there is no cure for DM1. But recent studies show the efficiency of new molecules named lipid mediators to target MSC function and inflammation. Among these molecules, maresin 2 (MR2), resolvins D1 (RvD1) and D2 (RvD2) have shown in studies their active role in resolving inflammation. However, their therapeutic potential for the treatment of muscle diseases remains unknown. Objectives: 1) Determine the inflammatory profile in muscle tissues and MSC coming from biopsies of DM1 patient in comparison to healthy individuals 2) Evaluate the effects of lipid mediators on MSC function in DM1. Methods: Muscle tissues and MSC were obtained from DM1 patients (n=8, 6 women and 2 men) and healthy subjects (n=4, 2 women and 2 men). Gene expression was measured by single cell sequencing and macrophage quantification was performed on muscle section. The impact of lipid mediators on MSC function and on inflammatory gene expression was assessed by immunofluorescence and RT- qPCR, respectively and analyzed with unpaired t-tests. Results: Overexpression of macrophages (1,77-fold) and several inflammatory genes such as CXCL1 (6,5-fold), IL1b (3-fold), IL6 (1,4-fold) and CXCL8 (10,8-fold) were measured in DM1 subjects compared to healthy subjects. RvD2 significantly stimulated proliferation. MR2 and RvD2 significantly increased MSC differentiation in DM1 cells. Finally, RvD1, RvD2 and MR2 induced a decrease on inflammation genes such as TNFa, IL1 or IL6. Conclusion: This study has shown the efficiency of some family of lipid mediators to improve MSC myogenic function and also to dampen inflammation in DM1. Thus, these molecules represent a new hope to target multiple defects observed in DM1 to limit muscle impairments in this disease.

3.3 INTRODUCTION

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is an autosomal dominant disease. It is the most frequent myopathy in adults, with a worldwide prevalence of 1:8,000^{1,2}. DM1 is caused by an expansion of CTG repeats in the non-coding region of the *dystrophia myotonica protein kinase (DMPK)* gene on chromosome 19q^{3,4}. There is less than 37-50 CTG repeats in the *DMPK* gene in healthy individuals, but there can be thousands of these repeats in DM1 patients. The disease is divided in five clinical forms: congenital, infantile, juvenile, adult, and late-onset, which are moderately correlated with the number of CTG repeats (i.e. higher number of repeats in early forms of the disease)⁵. In DM1, the *DMPK* gene transcription leads to the formation and accumulation of toxic mRNA including CUG hairpin structures, which causes the binding of the RNA-binding proteins muscleblind-like 1 (MBNL) and the upregulation of the protein CUGBP1 Elav-Like Family member 1 (CELF-1), resulting in the formation of nuclei foci.⁶⁻⁸ These alterations lead to impaired alternative splicing, and disrupted mRNA translation and stability that contribute to the DM1 pathology.

DM1 is a rare and multisystemic disease that affects the whole-body system and particularly skeletal muscle, heart, and brain.⁹ DM1 patients are subjected to progressive muscle weakness and atrophy.⁷ Muscle stem cells, also called satellite cells, are also affected in this disease.¹⁰ These cells are essential for skeletal muscle growth (especially at juvenile age) and regeneration.^{11 12}. After an injury, quiescent satellite cells are activated become proliferative myoblasts. After multiple rounds of cell division, myoblasts exit cell cycle either to self-renew to maintain the pool of cells, or to differentiate and fuse together or to damaged myofibers.¹³ In DM1, satellite cells are characterized by signs of premature senescence (irreversible cell cycle arrest), and by a reduction in their proliferative capacity.^{14 10} Moreover, myoblast differentiation and fusion into myotubes is also impaired in DM1.^{15 16} In a mouse model of DM1, skeletal muscle injury leads to reduced satellite cell proliferation, differentiation, and size of the newly formed muscle fibers.¹⁷

In addition to these intrinsic defects, the presence of a chronic inflammatory process also impairs the function of satellite cells in different muscular dystrophies.¹⁸ In healthy regenerating muscles, the inflammatory process is characterized by an initial

accumulation of pro-inflammatory macrophages that release paracrine factors (e.g. Tumor Necrosis Factor α [TNF α] and Interleukin 1 β [IL1 β]) promoting myoblast proliferation, which is followed by a switch in their phenotype toward anti-inflammatory macrophages that secrete factors (e.g. Interleukin 10 [IL10]) promoting myoblast differentiation.¹⁹ In muscular dystrophies, such as Duchenne Muscular Dystrophy, macrophages adopt a hybrid phenotype expressing pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines (e.g. TNF α and tumor growth factor [TGF- β]) at the same time leading to conflicting signals to satellite cells and other cell types.²⁰ In DM1, studies have shown high levels of the pro-inflammatory cytokine TNF α and IL6 in the serum of patients, which is correlated with disease stage and CTG expansion^{21 22}. However, the presence of local signs of inflammation in the skeletal muscle has never been carefully investigated.

Our recent findings showed that specialized pro-resolving mediators, especially Resolvin-D2 (RvD2), can concomitantly dampen inflammation and target myogenic cells to stimulate their regenerative potential in Duchenne Muscular Dystrophy (DMD).²³ Considering that muscle stem cell defects and systemic inflammation are hallmarks of DM1, these molecules have a high therapeutic potential for the treatment of this disease. Specialized pro-resolving mediators are biosynthesized from omega-3 fatty acids (eicosapentaenoic acid [EPA] and docosahexaenoic [DHA]) or omega-6 fatty acids (arachidonic acid) by the action of the enzymes 5-lipoxygenase (5-LOX), 12-lipoxygenase (12-LOX) and/or 15-lipoxygenase (15-LOX).²⁴ Four classes of specialized mediators have been described, the lipoxin, resolvins (-D and -E), protectins, and maresins. These molecules mediate their effects by binding to specific G protein-coupled receptors, such as Ccklr1 (Chemerin Chemokine-Like Receptor 1) for Resolvin-E1 (RvE1), and Gpr18 (G Protein-coupled Receptor 18) for RvD2.²⁵ Specialized pro-resolving mediators have proven their efficiency to stimulate phagocytosis of cellular debris, decrease inflammation by inhibiting expression of pro-inflammatory cytokines and restore homeostasis tissues in a wide variety of disease models²⁶.

Here, we demonstrate that there are systemic and local signs of inflammation in DM1, which are correlated with muscle weakness. By isolating muscle stem cells from DM1 patients and age and sex-matched healthy controls, we demonstrate by single-cell RNA

sequencing that myogenic cells are a source of inflammatory cytokines in DM1. Following the demonstration of this inflammatory environment in DM1 muscle, we pushed the experiments further by treating myogenic cells with pro-resolving lipid mediators in order to evaluate their capacity to dampen inflammatory cytokine production. Hence, we screened for different specialized pro-resolving mediators and we have identified that resolvins-D1 (RvD1), RvD2 and Maresin 2 (MR2) can directly target myogenic cells to reduce their expression of specific pro-inflammatory cytokines and restore their proliferation and differentiation/fusion potential. These findings support the therapeutic potential of specialized pro-resolving mediators for the treatment of DM1.

3.4 METHODS

3.4.1 Participants

Participants included in this study were recruited originally to take part to a larger longitudinal study, which includes fourth data collections over 17 years. Data related to muscle strength and blood samples were collected during the first phase held in 2002-2004 and muscle biopsies were collected during the fourth phase in 2019. All participants were recruited from the 416 DM1 patients followed at the Saguenay Neuromuscular Clinic at this time, as previously described.²⁷ Several days of clinical assessments were performed, and only a subset of data is reported here. Inclusion criteria were to be aged over 18-year-old, have a genetically confirmed diagnosis of DM1 with the late-onset or adult form, and be able to give an informed consent. Healthy control participants have also been recruited in 2019. The study was approved by the ethic review board of the *Centre de santé et de services sociaux de Chicoutimi*, Canada.

3.4.2 Muscle strength and pro-inflammatory cytokines blood sample analyses

In the first phase of the longitudinal study, the Muscular Impairment Rating Scale (MIRS)²⁸, a disease-specific scale to assess muscular impairment in DM1, was assessed by a trained physical therapist. MIRS is a 5-point ordinal scale based on manual muscle testing: 1, no muscular impairment; 2, minimal signs; 3, distal weakness; 4, mild to moderate proximal weakness; and 5 severe proximal weakness. The maximum isometric muscle strength was also assessed using quantitative muscle testing according to a

standardized protocol.²⁹ Briefly, ankle dorsiflexors, hip flexors, knee extensors and knee flexors muscle groups were evaluated with a handheld dynamometer (Microfet – 2, Hoggan Health Industries, Salt Lake City, UT). Participants were positioned according to standardized procedures, as previously published.⁷² The lever arm was measured to report the results in newton meters. Maximal muscle strength evaluations were done with at least two trials: if the two initial trials had more than 10% difference, a third trial was performed and the mean of the two closest peak values was used for the final analyses. All muscle groups were evaluated on both sides except if the participant had an injury preventing the use of maximal strength. The predicted maximal strength was also calculated from Hogrel et al. formula.³⁰ A blood sample was also collected from each participant and the level of tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interleukin 6 (IL6) was measured at the medical laboratory of the Hôpital de Jonquière, Canada.

3.4.3 Muscle biopsy

In the fourth phase of the longitudinal study, muscle biopsies were collected from the *vastus lateralis* muscle. Skin was disinfected and anesthetized with 2% lidocaine a 1 cm incision was made at 15 cm above the patella. Suction-modified Bergstrom muscle biopsy technique was performed to collect the muscle sample.⁷³ Muscle samples were rinse in sterile phosphate buffered saline solution (PBS). Half of the sample (approximately 100 mg) was kept in sterile SK-MAX media (Wisent Bio) on ice for muscle stem cell isolation. The second half of the muscle sample was flash frozen for qPCR analysis (50 mg) or embedded in OCT tissue freezing medium and frozen in 2-methylbutaned cooled in liquid nitrogen (50 mg). The samples were stored at -80°C.⁶⁷

3.4.4 Muscle stem cell isolation, purification and primary myoblast culture.

Muscle stem cells (MuSC) were isolated from muscle biopsies, purified by fluorescence-activated cell sorting (FACS), immortalized and cultured.⁷¹ Cells were allowed to expand in SK-MAX medium supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (GIBCO). Myoblasts were purified by FACS using LSR Foretessa flow cytometer. A gating strategy based on forward scatter and side scatter profiles, and 7AAD (1:40; biolegend) was used to remove debris and select viable cells. Positive selection with FITC conjugated antibody for anti-human CD56 (Clone B159;

1:10; BD biosciences) and AF647 conjugated with antibody for anti-human CD82 (Clone 423524; 1:10, BD biosciences). For proliferation assay, cells were incubated in SK-MAX medium supplemented with 20% FBS and 1% penicillin/streptomycin. For differentiation assay, cells were incubated with DMEM low glucose differentiation media with 2% of horse serum (Wisent) and 1% penicillin/streptomycin. Media were supplemented daily with 250 nM of RvD1, RvD2, Maresin 2 (Cayman chemical) or vehicle (ethanol).⁶⁸

3.4.5 qRT-PCR

Total RNA was extracted from satellite cells using TRIzol (Invitrogen) and was quantified with a NanoDrop 8000 spectrophotometer (Thermo scientific). To obtain cDNA the reverse transcription was performed on 1 µg of RNA using the reverse transcriptase kit (Qiagen). Primers were designed on Primer Blast (NCBI) and validated as described previously.³¹ qPCR amplification was performed on a Roche LightCycler 480. Data were normalized relative to the expression of the housekeeping gene *RLPO* or *TBPI* designed with OligoAnalyzer Tool (IDTNDNA) and purchased from BIOCORP.⁶⁹

3.4.6 Immunofluorescence

Muscle biopsies were cut at 10 µm thick in using a NX50 Cryostar (Thermo). Slices were put on positively charged Superfrost slides. Immunostaining was performed on skeletal muscle sections or on primary myoblast cultured on plastic dishes.³² Samples were fixed with 2% PFA for 5 minutes for tissue sections and 10 minutes for cells. Sections were incubated with a blocking solution containing 5% goat serum, 2% of donkey serum and 2% of bovin serum albumin in PBS (BSA) for 60 minutes at room temperature.⁷⁰ Sections were incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies diluted in blocking solution: CD68 (Clone KP1; 1:100; Thermofisher), CD86 (polyclonal; 1:50; biossusa), CD163 (polyclonal;1:100;biossusa), MF20 (Monoclonal; 1:500; DSBH), MYOG (Monoclonal;1: 500; abcam) and KI67 (Clone SoIA15; 1:500; Fisher Scientific). Samples were rinsed with PBS and incubated with appropriate secondary antibodies, anti-mouse IgG H+L (Alexa Fluor 594, 1:1000) and anti-rabbit IgG H+L (Alexa Fluor 488, 1:1000) diluted in PBS for 1 h at room temperature in the dark. Samples were washed with PBS and counterstained with DAPI. Slides were mounted using PermaFluor mounting medium (Fisher Scientific). Immunofluorescence pictures of samples were

taken with EVOS M5000 (Thermo Fisher Scientific) or Leica TCS SP8 DLS confocal microscope. Pictures were analyzed using ImageJ software (version 1.53, National Institutes of Health, USA).

3.4.7 Single cell RNA-sequencing

Three control and three DM1 cell lines have been pooled (5,000 cells per sample). Single cell RNA sequencing (scRNAseq) libraries were prepared using the chromium Next GEM Single Cell 3' Kit v3.1 (10x Genomics) according to the manufacturer instructions. Generated libraries were sequenced using an Illumina NovaSeq at the CHU Sainte-Justine and Genome Quebec Integrated Genomics Core. Raw sequencing data were processed with 10x Genomics Cell Ranger software and customized pipeline in R with the computational package SEURAT v3³³ on remote computing servers (Calcul Canada), based on best practices³⁴. Dimensional reduction techniques were used using Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) to visually represent single cells. We also identify the downstream signaling pathways activated by conducting gene set enrichment analysis (GSEA) using NCATS bioplanet of pathways.

3.4.8 Statistical analysis.

For blood sample analyses, participants were grouped based on their blood inflammatory profile: a blood concentration of TNF α and IL-6 higher than the one found in healthy subjects (2.53pg/ml for TNF- α and 4.45pg/ml for IL-6)³⁵ was considered as abnormal. All other participants were considered as normal. The predictive values of muscle strength of the ankle dorsiflexors, hip flexors, knee extensors and knee flexors were compared between participants' groups (normal, abnormal [IL6], abnormal [TNF α]) using one-way ANOVA with post-hoc Tukey ($p < 0.05$). Statistical analyses were conducted with SPSS version 28.0 (SPSS Inc., IBM Software Company, Chicago, USA).

For MuSc and tissue analyses, the experimenter was blinded to the identity of the sample for data collection and analysis. The experiments have been repeated at least twice in the laboratory with similar results. Data was analyzed by two-tailed Student's t-tests or One-way analysis of variance (ANOVA) uncorrected Fisher's Least Significant Difference (LSD) test using GraphPad software version 7.0a. Normality was verified for all data

according to the Shapiro–Wilk test. Results are reported as mean \pm standard error of the mean (SEM).

3.5 RESULTS

3.5.1 Participants

Data related to muscle strength and blood samples included in the first phase of the longitudinal study held in 2002-2004 were available for 103 participants. In addition, muscle biopsies collected during the fourth phase of the same study in 2019 were available for 10 patients and 15 healthy individuals. Patients and healthy individuals' characteristics are detailed in supplemental materials (Table 2).

3.5.2 Systemic inflammatory markers are associated with muscle weakness in DM1.

Blood samples were collected from 103 patients diagnosed with DM1 to analyze the levels of the pro-inflammatory cytokines TNF α and IL6 in the serum (see supplemental material 2 for DM1 participants' characteristics for blood analyses). Based on these findings, participants were separated into two categories: those with normal inflammatory profile (n=71) and those with elevated values of IL6 and/or TNF α (n=31) based on reference ranges of these cytokines.³⁵ Quantitative muscle strength was assessed in these patients in four muscle groups (ankle dorsiflexor, hip flexors, knee extensors, and knee flexors) and expressed as percentage of predicted value according to Hogrel's equations. In patients with normal inflammatory profile, the muscle force is lower than the predicted values based on normative data, which is consistent with the muscle weakness observed in this disease (Table 1).³⁵ In the patients with high inflammatory profiles, this reduction in muscle strength, driven by the blood concentration of IL-6, is significantly more severe than for patients with normal inflammatory profile. This significant reduction in muscle strength has been observed in all muscle groups in comparison to DM1 patients with normal inflammatory profile (p<0.05).

3.5.3 Signs of local inflammation in skeletal muscle of DM1 patients.

To assess local inflammation, skeletal muscle biopsies were collected from DM1 patients (>700 CTG repeats; n=10) and age- and sex-matched healthy controls (n=5) (see supplemental material (Table 3) for DM1 and healthy control participants' characteristics for muscular stem cells and tissue analyses). Immunofluorescence analysis on skeletal muscle section showed that there is an increase in pro-inflammatory macrophages (CD68⁺CD86⁺ cells) and anti-inflammatory macrophages (CD68⁺ CD163⁺ cells) in DM1 patients (Figure 1). This difference did not reach statistical significance due to the high interindividual variability. However, the population of individuals with high local inflammation is only observed in DM1 patients.

To identify the source of the pro-inflammatory signals in DM1 muscles, satellite cells were isolated from fresh muscle biopsies, cultured and purified *in vitro*. Myoblasts from 3 DM1 patients and 3 healthy and sex-matched healthy controls were pooled and analyzed by single cell RNA sequencing. After filtering and removal of doublets, 1,639 control cells and 1,742 DM1 patient cells were analyzed. UMAP plot showed distinct clustering for DM1 and control cells (Figure 2A). The differences in levels of gene expression are depicted on the volcano plot where the genes overexpressed in control cells (right side) are related to myogenesis (e.g. myogenic factor 5 *MYF5*, Inhibitor of DNA Binding 1 *ID1*) and cell division (e.g. Centromere Protein F, *CENPF*) (Figure 2B). The genes overexpressed in DM1 cell lines (left side) are mostly pro-inflammatory cytokines, such as *CXCL1*, *CXCL8*, *IL1B*, and *IL6* (Figure 2B). UMAP plot of these cytokines showed that they are located in a specific cluster of myoblasts expressing a pro-inflammatory profile. Gene Ontology (GO) term enrichment analysis indicated that the genes upregulated in control cells are related to biological processes such as cell cycle, Aurora B signaling, HES/HEY pathway, and Epidermal growth factor Receptor 1 (EGFR1) pathway (Figure 2D). GO term analysis of DM1 cells showed that the most upregulated pathways were associated with inflammation such as IL1 signaling, TNF α signaling, and oncostatin M, a member of the interleukin 6 family (Figure 2E).

3.5.4 Specialized pro-resolving mediators reduce the pro-inflammatory profile of DM1 myoblasts.

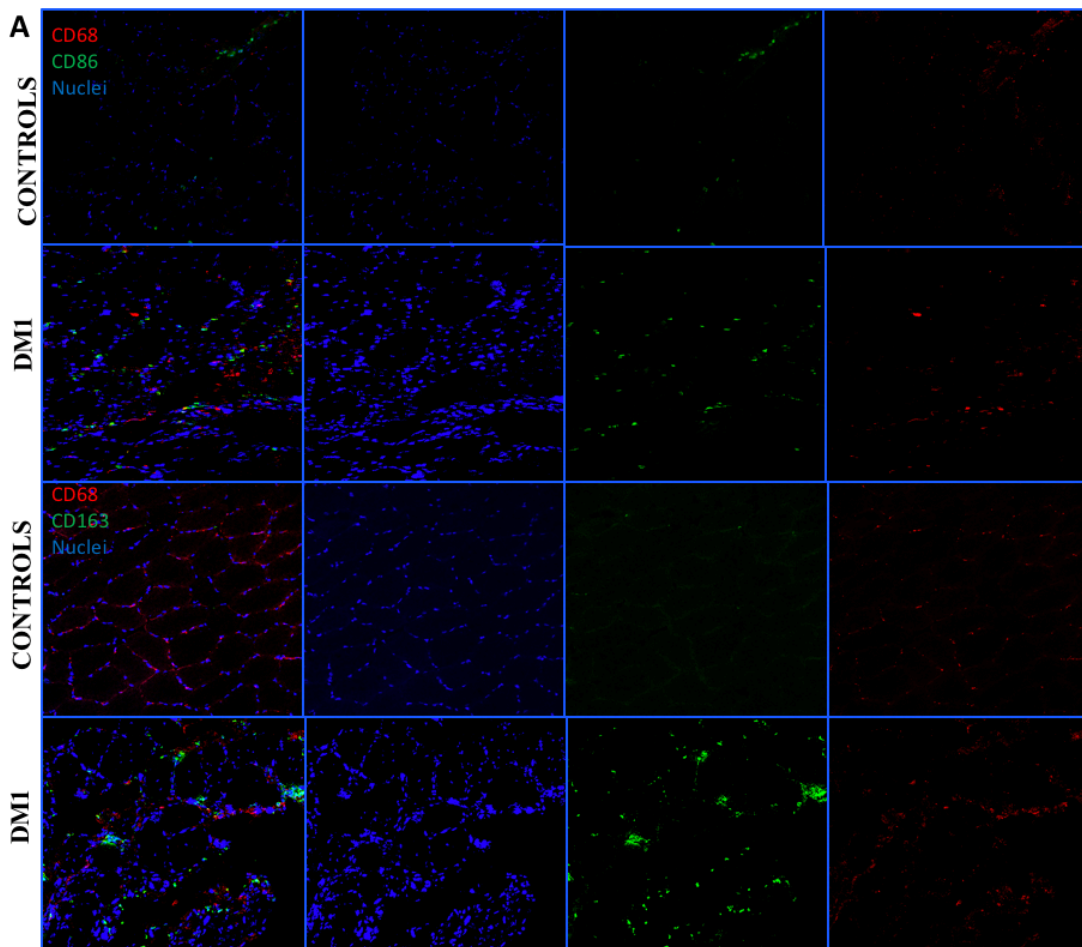
To evaluate the therapeutic potential of pro-resolving mediators to reduce the inflammatory markers in DM1, myoblasts were treated with different specialized pro-resolving mediators including RvD1, RvD2, MR2, LPXA4, PD1 and PGE2. Drug screening assay revealed RvD1, RvD2, and MR2 as the most promising therapeutic candidates. MTS viability revealed that these specialized pro-resolving mediators did not reduce cell viability at the different concentrations tested (50, 100, 250, 500, 1000 nM) (supplemental material: Figure 6). qPCR analysis of the pro-inflammatory cytokines IL1, IL6, and TNF α was performed on the treated DM1 myoblasts. MR2 reduced the expression of IL1 (Figure 3). RvD2 significantly reduced the expression of TNF α , while RvD1 showed a trend in the reduction of this cytokine ($p=0.09$) (Figure 3).

3.5.5 Specialized pro-resolving mediators restore myogenesis capacity of DM1 myoblasts.

The ability of RvD1, RvD2, and MR2 to restore DM1 myoblasts proliferation, differentiation, and fusion was evaluated *in vitro*. Analysis of the proliferation marker Ki67 on DM1 myoblasts treated with specialized pro-resolving mediators showed that RvD2 significantly increases cell proliferation (Figure 4). A similar trend is observed in myoblasts treated with RvD1 and MR2, but this difference is not significant (Figure 4). Myoblast differentiation and fusion were assessed by immunofluorescence using the markers DAPI and Myosin Heavy Chain (MyHC) in myoblast differentiated for 5 days (Figure 5A). Analysis of the fusion index in MyHC-stained myotubes showed that MR2 and RvD2 significantly increased myoblast fusion, while this difference was not significant in RvD1-treated cells (Figure 5B).

Muscle group	Muscle strength % of the predicted value		
	Normal (n=71)	Abnormal [IL6] (n=23)	Abnormal [TNF- α] (n=9)
Ankle dorsiflexors	65.0 (28.1)	46.4 (22.9)* (n=22)	67.5 (39.2)
Hip flexors	72.6 (17.5)	55.9 (18.6)*** (n=22)	70.2 (7.7) (n=8)
Knee extensors	70.8 (19.0) (n=70)	57.5 (19.9)* (n=22)	66.4 (24.0)
Knee flexors	88.4 (21.2) (n=70)	74.8 (20.2)*	88.0 (10.4) (n=7)

Table 1: Comparison of muscle strength between participants based on their blood concentration of IL6 and TNF α . Percentage of the predicted strength for 4 muscle groups for individuals with DM1 with normal and high inflammatory profiles. Predictive equations developed by Hogrel for the calculation of muscle strength are based on normative data of quantitative isometric muscle strength. IL6 and TNF α were compared to control. IL6 p value are significant for each muscle groups: p=0.022 for ankle dorsiflexors, p<0,001 for Hip flexors, p=0,018 for knee extensors and p=0,022 for Knee flexors. Inflammatory profiles have been determined on values found in literature for TNF α and IL6. * p \leq 0,05 *** p \leq 0,001



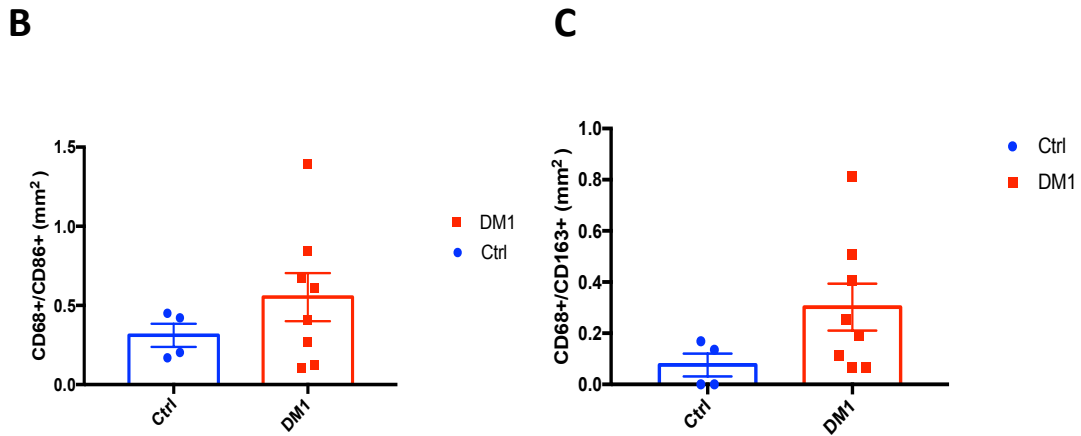


Figure 1: M1 and M2 macrophages quantification. (A) Representative images of immunofluorescence carried out on skeletal muscle tissues of DM1 participants (n=10) and healthy subjects (n=4) stained for CD68 (total M1/M2 macrophages markers ; red on pictures), CD86 (M1 macrophages marker ; green on pictures) and CD163 (M2 macrophages marker ; green on pictures). (B) Quantification of total number of M1 macrophages in healthy subjects and DM1 participants tissues (C) proportion of M2 macrophages in healthy subjects and DM1 participants tissues.

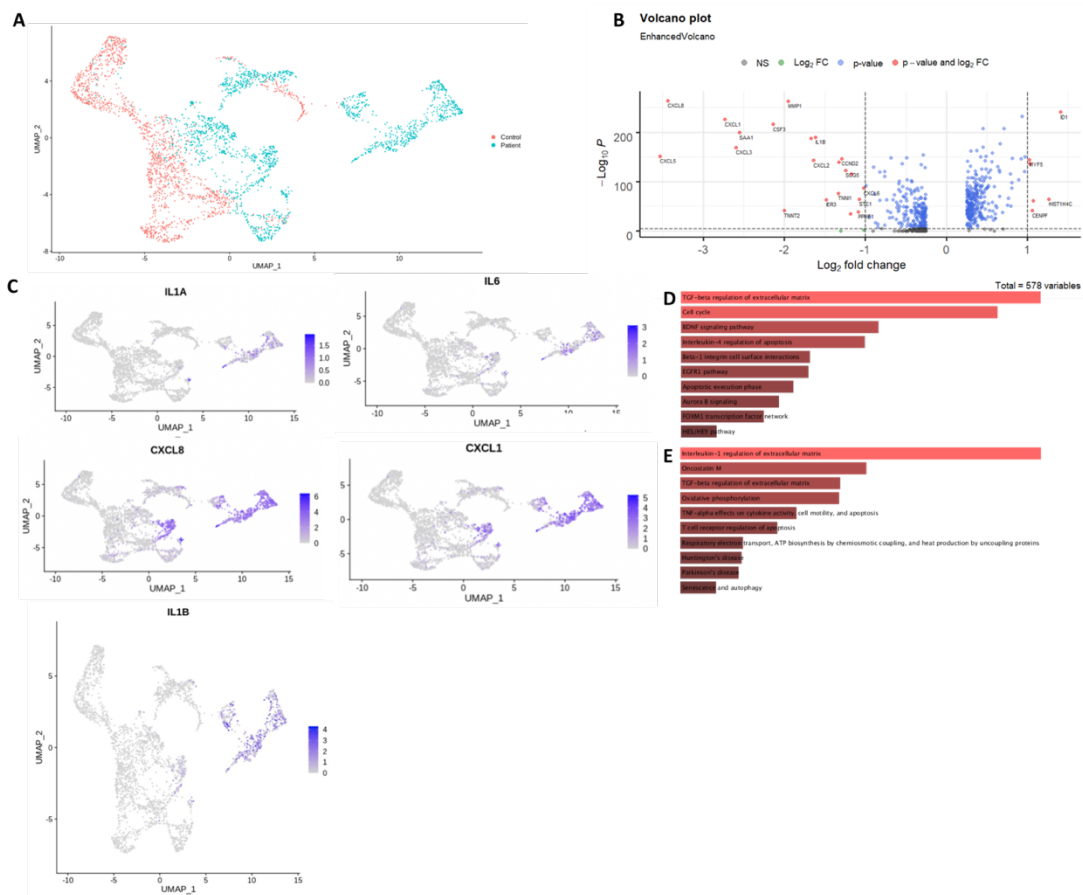


Figure 2: Single cell RNAseq analysis. (A) UMAP visualization for DM1 participants and healthy subjects clusters demarcated by colors to identify myogenic cells sorted from DM1 participant's biopsies (n=3) in blue and from healthy subject's biopsies (n=3) in red. (B) Volcano plot representing the difference in expression of genes for DM1 myogenic cells (on left) as compared to healthy subjects myogenic cells (on right). Each red dot on the left represents a gene significantly overexpressed by DM1 myogenic cells and each reds dot on the right are genes overexpressed by healthy subject's myogenic cells. (C) Inflammatory genes labeled by patient cells. (D) GO term analysis of differentially expressed genes in controls (D) and cells DM1 cells (E).

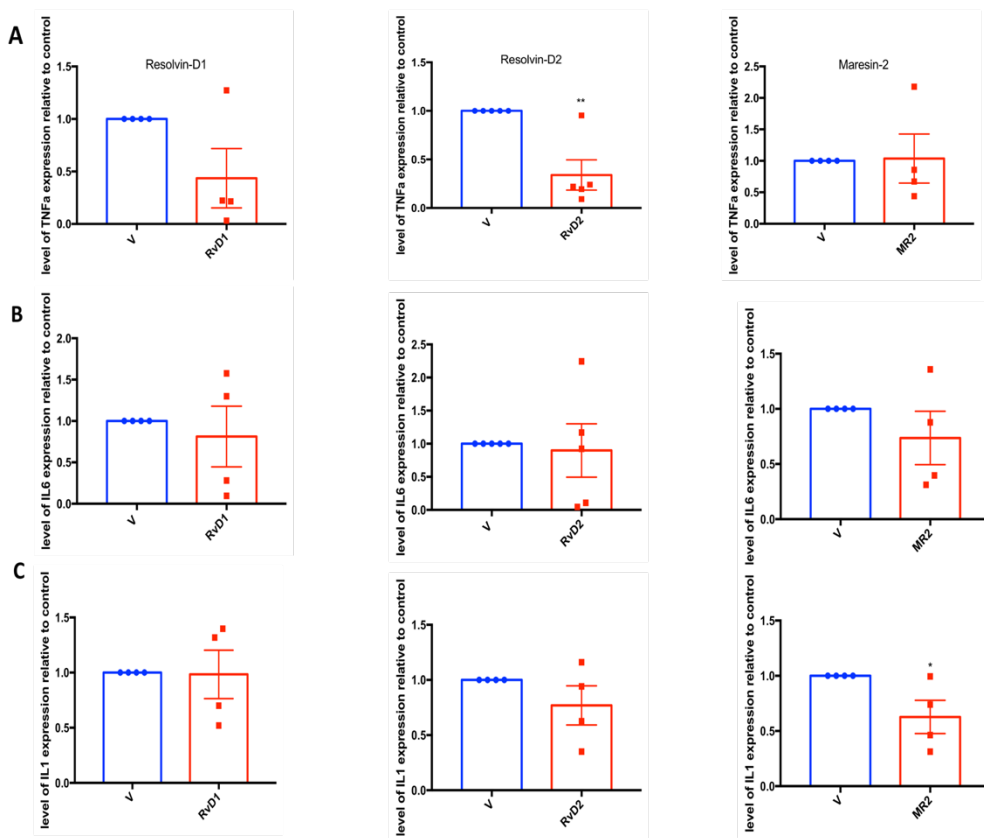
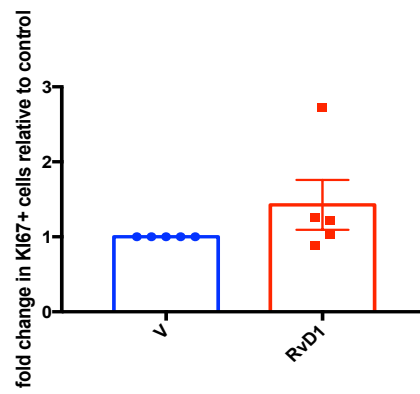
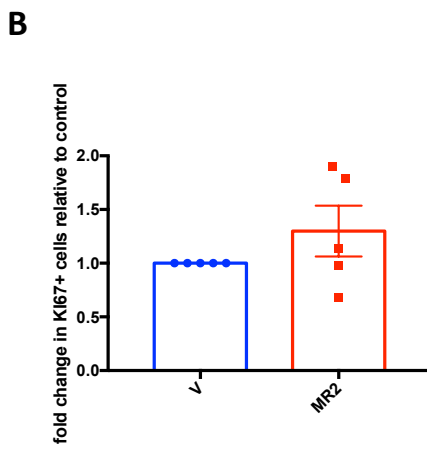
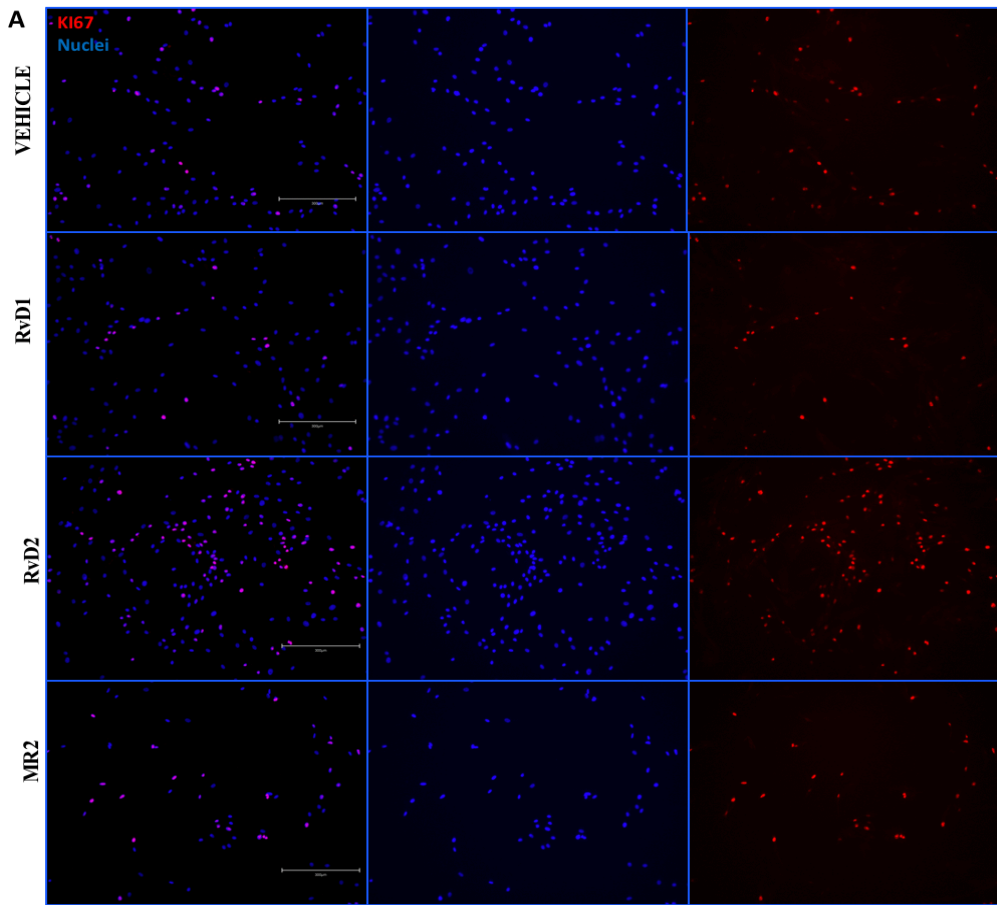


Figure 3: Effects of lipid mediators on inflammatory genes expression. Effect of RvD1 (n=4), RvD2 (n=5) and MR2 (n=5) on TNF α (A) Interleukine-6 (IL6) (B), and Interleukin 1 (IL1) (C) expression after 7 days of treatment. Non treated cells are represented by blue bar and treated cells by red one. Data are represented as mean \pm SEM. Statistical analysis unpaired t test, $p < 0.05$. (B) ** $p < 0.005$.



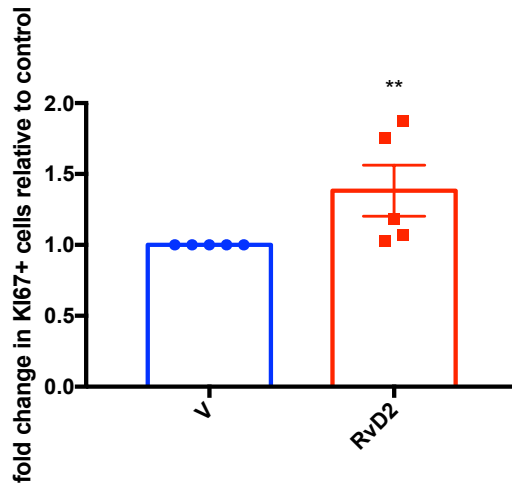
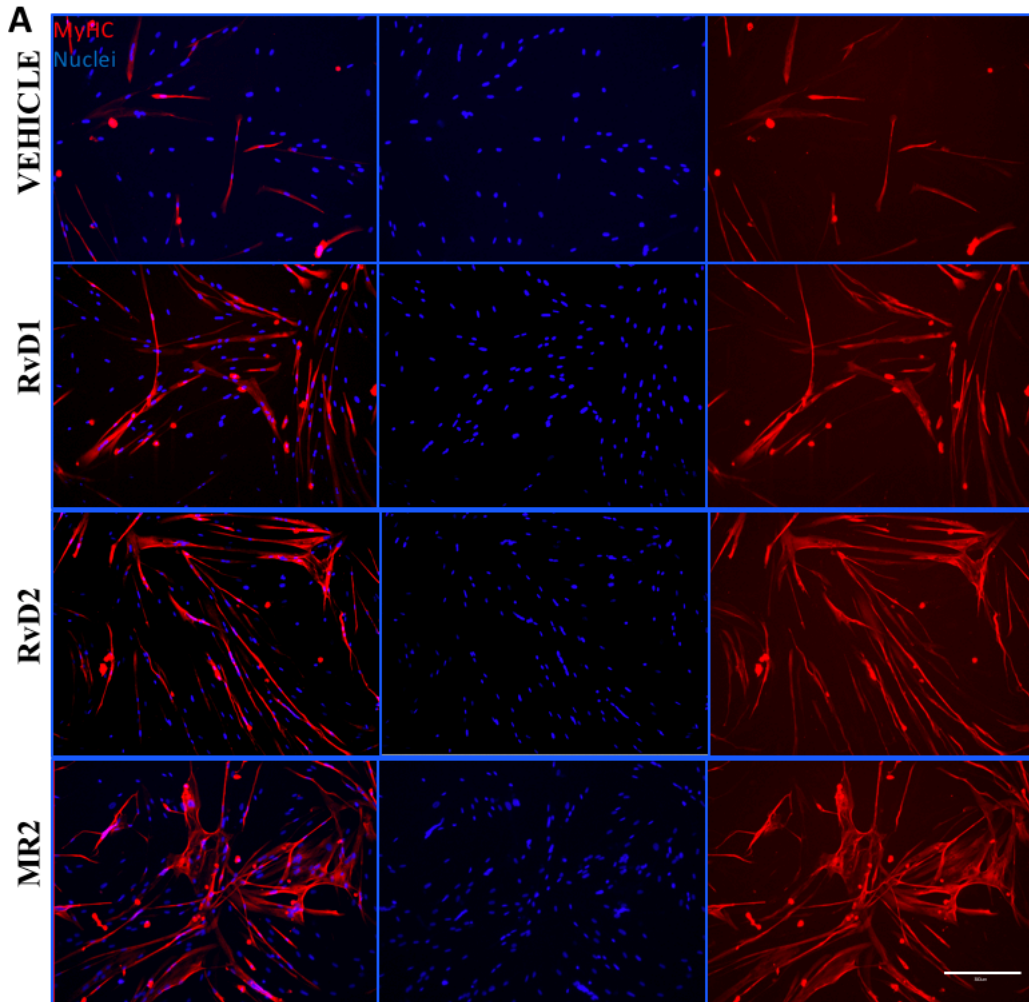


Figure 4: Effect of lipid mediators on proliferation (A) Representative image of immunofluorescence for DAPI (blue) and KI67 (red) on myoblast cells after four days of treatment with RvD1, RvD2, MR2 or with ethanol as a vehicle. (B) Quantification of the proliferation for RvD1, RvD2 and MR2. Data are represented as mean \pm SEM; n=5 for each group. Statistical analysis unpaired t test, $p < 0.05$. * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$.



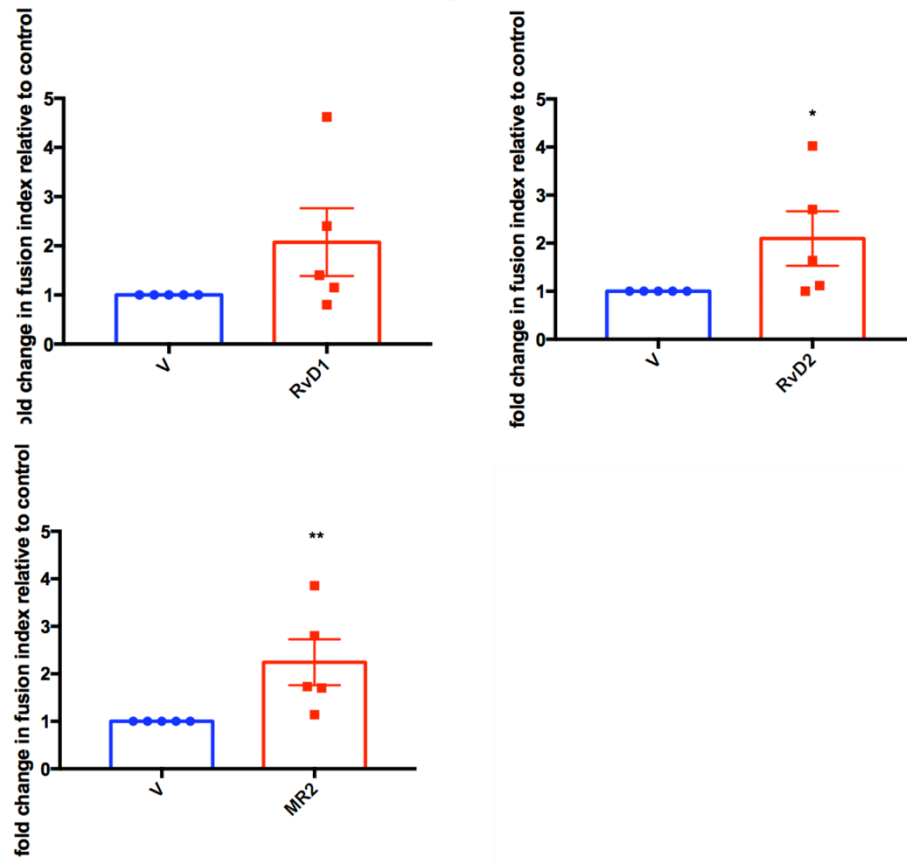
B

Figure 5: Effects of lipid mediators on differentiation (A) Representative images of immunofluorescence for MyHC (red) and DAPI (blue) on differentiated myoblasts into myotubes for 5 days of treatment with RvD1, RvD2 and MR2 or with ethanol as a vehicle. (B) Quantification of the fusion index for RvD1, RvD2 and MR2. Data are represented as mean \pm SEM; n=5 for each group. Statistical analysis unpaired t test, $p < 0.05$. * $P < 0.05$ **

3.6 DISCUSSION

Our findings show that there is systemic inflammation in DM1 patients. Also, patients with high inflammatory profile exhibited reduced muscle strength. Signs of local inflammation are also observed in skeletal muscles, in which myogenic cells express a strong pro-inflammatory signature. Treatment of DM1 myoblasts with the specialized pro-resolving mediators, especially RvD2 and MR2, reduce their expression of pro-inflammatory cytokines and restore partially myoblast proliferation and differentiation/fusion. These findings support the potential of specialized pro-resolving mediators as a novel therapeutic strategy for the treatment of DM1.

Muscle weakness is a hallmark of DM1.⁷ Our study demonstrated a link between the serum levels of TNF α and IL6, and muscle impairments, suggesting that chronic inflammation contributes to the disease. An increase in the circulating levels of pro-inflammatory cytokines associated with muscle wasting has also been observed in other muscular disorders such as sarcopenia, chronic obstructive pulmonary disease, and cancer cachexia.³⁶⁻³⁸ Our findings are consistent with another study showing that the levels of TNF α and IL6 are associated with cardiac dysfunctions in DM1²¹. However, to date, the presence of local inflammation in muscle of DM1 patients has not been investigated. Our findings show that muscles from DM1 patients tend to have a higher number of macrophages compared to muscles from healthy individuals. There is a large heterogeneity in the levels of macrophages in skeletal muscles across individuals affected by DM1, similar to what we observed with systemic inflammation (*i.e.* some DM1 patients have a high inflammatory profile while others have a normal inflammatory profile). Chronic accumulation of inflammatory cells has been observed in several muscle diseases, particularly in Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), and are associated with muscle wasting and impaired muscle regeneration. In DMD, the depletion of macrophages improved muscle fiber size, regeneration and function.^{39,40}

In healthy regenerating muscles, the consecutive accumulation of pro-inflammatory macrophages followed by anti-inflammatory macrophages is essential to promote myoblast proliferation and differentiation/fusion, respectively.⁴¹ In skeletal muscle of DM1 patients, our findings show that there is a concomitant increase in both pro-inflammatory macrophages (CD68+CD86+ cells) and anti-inflammatory macrophages

(CD68+CD163+ cells). A similar accumulation of both macrophage phenotype simultaneously is also observed in DMD.^{39 42} These macrophages are characterized by a hybrid phenotype that express both pro-inflammatory (TNF α) and anti-inflammatory cytokines TGF at the same time²⁰, which sends conflicting signals to myogenic cells and impairs their regenerative capacity.¹⁸ The stimulation of macrophage phenotype switching toward their anti-inflammatory phenotype using pharmacological or genetic tools restores their capacity to promote myogenesis.^{23 43} Altogether, these findings suggest that chronic inflammation is a pathological feature of DM1, which opens new therapeutic avenues for the treatment of this disease.

Our single cell transcriptomics analysis demonstrates that myogenic cells are a source of pro-inflammatory cytokines in DM1. These results do not exclude that other cell types (e.g. fibro-adipogenic progenitors, macrophages) also produce these cytokines in skeletal muscle of DM1 patients. Our findings show that DM1 patients myogenic cell lines overexpress many *C-X-C-L* chemokines including CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, and CXCL8 compared to healthy control cells lines. These chemokines are normally transiently overexpressed after a muscle injury and decrease rapidly after the initial acute injury period⁴⁴. The chronic expression of these chemokines by myogenic cells in DM1 could promote the persistent recruitment of macrophages⁴⁵. Myogenic cells from DM1 patients also express high levels of IL6 and TNF α which could explain, at least in part, the increase in the circulating levels of these cytokines. Moreover, TNF α and IL6 have opposite effects on macrophage polarization, the former promotes the pro-inflammatory phenotype, while the latter stimulates the anti-inflammatory phenotype.⁴⁶⁻⁴⁸ These conflicting signals are consistent with the rise in both pro-inflammatory and anti-inflammatory macrophages in DM1 skeletal muscles. A similar increase in IL6 and TNF α was also observed in skeletal muscle in DMD, a condition associated with chronic accumulation of macrophages and disturbed phenotype polarization⁴⁹. Altogether, these findings suggest that the expression of pro-inflammatory cytokines by myogenic cells disturbs macrophage accumulation and polarization, which in turn impairs the myogenesis capacity of satellite cells.

The high expression of pro-inflammatory cytokines by myogenic cells could also have an autocrine effect that directly reduces their myogenesis capacity. Pathway enrichment

analyses have shown that TNF α , TGF- β , IL1, and IL6 pathways are the most upregulated in DM1 myoblasts compared to controls. These pathways are well known to impair myogenic cell differentiation and fusion. For instance, TNF α activates the NF-kB pathway that stimulates the degradation of MyoD and inhibits myogenic differentiation.^{50,51} TGF- β signaling blocks myoblast fusion and myotube formation (without affecting cell differentiation).^{52,53} IL1 β was shown to strongly increase the expression of PGE₂ in myoblasts, which is known to block myogenic differentiation in DM1.^{54,55} IL6 can have opposite effects on cell differentiation depending on its timing and concentration.⁵⁶ These findings suggest that dampening the expression of pro-inflammatory cytokines in DM1 myoblast could help to restore their myogenic capacity.

We investigated the therapeutic potential of specialized pro-resolving mediators to dampen inflammation and restore myogenesis in DM1. These molecules derived from omega-3 and -6 fatty acids have emerged as key regulators of inflammation.⁵⁷ After a muscle injury, there is an initial peak in the expression of pro-inflammatory lipid mediators, such as prostaglandins, that is followed by a rise in the expression of specialized pro-resolving mediators (lipoxins, resolvins, protectins, maresins)^{58 59} This lipid mediator class switching is impaired in DMD, and following muscle injury in aged mice.^{23 60} Previous studies have shown that the administration of the specialized pro-resolving mediators, RvD1 or RvD2, in regenerating skeletal muscles reduces the expression of pro-inflammatory cytokines (IL1B, IL6, TNF α) and promotes the switch of macrophages toward their anti-inflammatory phenotype.^{58 59} Similarly, using a DMD mouse model, we previously demonstrated that RvD2 administration reduces the expression of different pro-inflammatory cytokines (e.g. TNF α , *CXCL1*) by macrophages *in vitro*, and it dampens inflammation in dystrophic skeletal muscles *in vivo*²³. Consistent with the anti-inflammatory effect observed on macrophages, our findings demonstrate that specialized pro-resolving mediators reduce the expression of different pro-inflammatory cytokines in myogenic cells of DM1 patients. RvD2 decreases the expression of TNF α by myogenic cells *in vitro*, which could explain its positive impact on myogenesis. TNF α is known to destabilize MyoD at the RNA and protein levels thereby inhibiting myoblast differentiation.^{50,51} Inhibition of TNF α by knockdown or neutralizing antibodies improves myoblasts differentiation and fusion.^{61,62} The effect of RvD1 on the secretion of pro-inflammatory cytokines by myogenic cells is milder

compared to RvD2, although a trend in the reduction of TNF α expression is observed. A previous study showed that RvD1 reduces the expression of TNF α in LPS-stimulated C2C12 myoblasts⁵⁹. The strongest immunomodulatory effect of RvD1 in this study could be attributable to the different cell lines used or to the utilization of a potent stimulating agent. The authors also showed that RvD1 treatment protects against the reduction in myotube size induced by TNF α exposure to C2C12 myoblasts⁵⁹. In accordance, our findings showed that the reduction of TNF α expression in DM1 myogenic cells is associated with improved differentiation and fusion capacity. RvD2 that is more potent than RvD1 to reduce TNF α levels display a stronger capacity to improve myoblast proliferation and differentiation. While we focused our analyses on the top pro-inflammatory pathways identified by single-cell RNAseq (scRNAseq) (IL1, IL6, TNF α), the specialized pro-resolving mediators could also affect the expression of other paracrine factors that regulate myogenesis. For instance, in DMD, RvD2 was shown to reduce the expression of COX2, the enzyme responsible for the production of PGE₂, a factor known to impair myogenic cell differentiation in DM1.^{23,54}

Our results demonstrate that, contrary to RvD1 and RvD2, MR2 administration does not affect TNF α expression, but it reduces IL1 expression. Alike TNF α , this pro-inflammatory cytokine is a potent inducer of NF-kB.⁶³ There is a limited number of studies on MR2; however, it was shown that MR1 reduces the expression of IL1, IL6, and TNF α , and consequently inhibits the activation of the NF-kB pathway in a model of sepsis.⁶⁴ The classical NF-kB pathway plays a key role during myogenesis by preventing myogenic differentiation through multiple mechanisms such as MyoD destabilization⁶⁵. In DMD, NF-kB pathway is chronically upregulated, and inhibition of this pathway with genetic or pharmacological tools restores myogenesis.⁶⁶ In accordance with these studies, our findings demonstrate that the MR2-induced reduction in IL1 expression is associated with an increase in myoblast differentiation.

Our findings suggest that the reduction in pro-inflammatory cytokines contributes to the myogenic effect of specialized pro-resolving mediators. In addition, these molecules could also directly stimulate myogenesis by binding to specific receptors. RvD1 binds to ALX/FPR2 and GPR32, while RvD2 binds to GPR18.²⁵ The receptor for MR2 has not been identified yet. A previous study has shown that treatment of C2C12 myoblasts with

RvD1 *in vitro* induces a mild increase in the size of the newly formed myotubes.⁵⁹ On the other hand, *in vitro* treatment of mouse primary myoblasts with RvD2 induces a strong increase in myoblast differentiation and fusion.²³ Our findings also support the more potent myogenic capacity of RvD2 compared to RvD1. This difference could be attributable to the fact that they target different receptors.

3.7 Study limitations

The main limit of this study was the number of participants. Due to the rarity of this disease, the access to participants and consequently to biopsies is restricted. However, to the best of our knowledge, our biobank is one of the most complete in DM1, especially for myoblasts cell lines. Another limit is the variability between myoblasts cell lines at baseline. This can be explained by the fact that biopsies were collected from different patients with different CTG repeat size, age, gender, and clinical phenotype. These differences are accentuated by somatic effects in which the CTG repetition varies from cell to cell and increase during the patient's lifetime.

3.8 CONCLUSION

In summary, we demonstrate that there is the presence of local and systemic inflammation in DM1 that is associated myogenic cell defects and muscle weakness. Specialized pro-resolving mediators, especially RvD2 and MR2, demonstrated their potential to dampen inflammation and restore the myogenesis capacity of myoblasts from DM1 patients. This study opens a new therapeutic avenue for the treatment of DM1, a disease for which there is very limited therapeutic options.

Supplemental materials

Characteristics	Total (n=103)	Blood inflammatory profile		
		Normal (n=71)	Abnormal [IL6] (n=23)	Abnormal [TNF- α] (n=9)
Age, y				
Mean (SD)	43.3 (10.1)	43.2 (10.9)	43.2 (7.8)	41.0 (8.9)
[<i>min-max</i>]	[20-77]	[20-77]	[30-69]	[26-58]
Sex, n (%)				
Men	38 (36.9)	27 (38.0)	9 (39.1)	2 (22.2)
Women	65 (63.1)	44 (62.0)	14 (60.9)	7 (77.8)
Phenotype, n (%)				
Late-onset	20 (19.4)	16 (22.5)	3 (13.0)	1 (11.1)
Adult	83 (80.6)	55 (77.5)	20 (87.0)	8 (88.9)
CTG repeat length				
Mean (SD)	576.1 (378.1)	586.5 (398.7)	578.8 (299.8)	486.8 (418.4)
[<i>min-max</i>]	[59-2000]	[59-2000]	[63-1089]	[60-1145]
MIRS n (%)				
1	6 (5.8)	5 (7.0)	1 (4.3)	0 (0)
2	13 (12.6)	10 (14.1)	2 (8.7)	1 (11.1)
3	26 (25.2)	17 (23.9)	5 (21.7)	4 (44.4)
4	54 (52.4)	38 (53.5)	13 (56.5)	3 (33.3)
5	4 (3.9)	1 (1.4)	2 (8.7)	1 (11.1)
Disease duration (n = 74), y				
Mean (SD)	19.7 (7.9)	20.0 (7.7)	20.3 (7.9)	15.8 (10.4)
[<i>min-max</i>]	[3-35]	[3-35]	[6-34]	[5-29]
TNF α level				
Mean (SD)	1.67 (1.61)	1.30 (0.47)	1.63 (0.43)	4.73 (4.34)
[<i>min-max</i>]	[0.47- 16.06]	[0.47-2.49]	[1.0-2.42]	[2.61-16.06]
IL6 level				
Mean (SD)	3.28 (3.25)	2.05 (0.84)	7.61 (4.62)	1.95 (0.93)
[<i>min-max</i>]	[0.72- 23.49]	[0.82-4.11]	[4.48-23.49]	[0.72-3.63]

Table 2. DM1 participants characteristics for blood analyses

Characteristics	DM1 participants (n=10)	Healthy controls (n=5)
Age, y		
Mean (SD)	42.1 (11.9)	37.0 (6.9)
[min-max]	[30-58]	[31-45]
Sex, n (%)		
Men	3 (30)	3 (60)
Women	7 (70)	2 (40)
Phenotype, n (%)		
Juvenile	8 (80)	---
Adult	2 (20)	---
CTG repeat length		
Mean (SD)	830 (220)	---
[min-max]	[554-1200]	---

Table 3 : DM1 and healthy control participants characteristics for muscular stem cells and tissue analyses

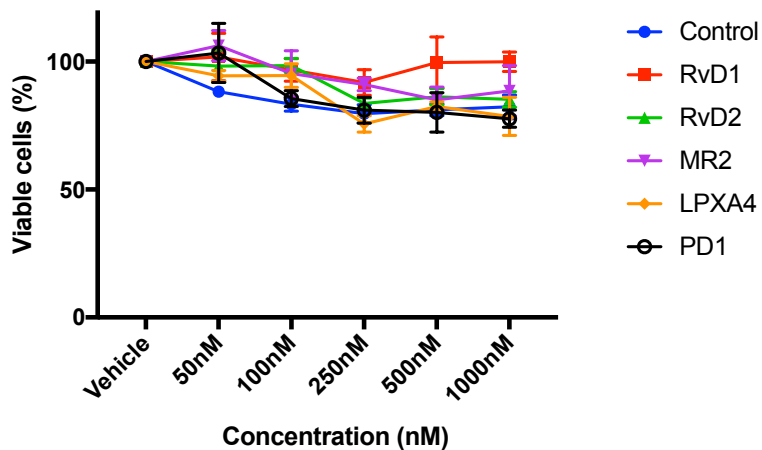


Figure 6: MTS viability assay on patient myoblasts treated with RvD1, RvD2, MR2, LPXA4 or PD1 at various concentrations.

3.9 REFERENCES

1. Harper PS. *Myotonic Dystrophy, 3rd ed, WB Saunders, London 2001.*
2. Bouchard, G., Roy, R., Declos, M., Mathieu, J. & Kouladjian, K. Origin and diffusion of the myotonic dystrophy gene in the Saguenay region (Quebec). *Can. J. Neurol. Sci. J. Can. Sci. Neurol.* **16**, 119–122 (1989).
3. Fu, Y.-H. *et al.* An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* **255**, 1256–8 (1992).
4. Shaw, D. J. *et al.* A study of DNA methylation in myotonic dystrophy. *J. Med. Genet.* **30**, 189–192 (1993).
5. De Antonio, M. *et al.* Unravelling the myotonic dystrophy type 1 clinical spectrum: A systematic registry-based study with implications for disease classification. *Rev. Neurol. (Paris)* **172**, 572–580 (2016).
6. Schoser, B. & Timchenko, L. Myotonic Dystrophies 1 and 2: Complex Diseases with Complex Mechanisms. *Curr. Genomics* **11**, 77–90 (2010).
7. Timchenko, L. Molecular mechanisms of muscle atrophy in myotonic dystrophies. (2013).
8. Mateos-Aierdi, A. J. *et al.* Muscle wasting in myotonic dystrophies: a model of premature aging. *Front. Aging Neurosci.* **7**, 125 (2015).
9. LoRusso, S., Weiner, B. & Arnold, W. D. Myotonic Dystrophies: Targeting Therapies for Multisystem Disease. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* **15**, 872–884 (2018).
10. Thornell, L.-E. *et al.* Satellite cell dysfunction contributes to the progressive muscle atrophy in myotonic dystrophy type 1. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **35**, 603–613 (2009).
11. Bachman, J. F. *et al.* Prepubertal skeletal muscle growth requires Pax7-expressing satellite cell-derived myonuclear contribution. *Dev. Camb. Engl.* **145**, dev167197 (2018).
12. Sambasivan, R. *et al.* Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Dev. Camb. Engl.* **138**, 3647–3656 (2011).
13. Dumont, N. A., Bentzinger, C. F., Sincennes, M.-C. & Rudnicki, M. A. Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Compr. Physiol.* **5**, 1027–1059 (2015).
14. Bigot, A. *et al.* Large CTG Repeats Trigger p16-Dependent Premature Senescence in Myotonic Dystrophy Type 1 Muscle Precursor Cells. *Am. J. Pathol.* **174**, 1435–1442 (2009).
15. Furling, D., Lemieux, D., Taneja, K. & Puymirat, J. Decreased levels of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and delayed differentiation in human myotonic dystrophy myoblasts. *Neuromuscul. Disord. NMD* **11**, 728–735 (2001).
16. Bhagavati, S., Bhagwati, S., Shafiq, S. A. & Xu, W. (CTG)_n repeats markedly inhibit differentiation of the C2C12 myoblast cell line: implications for congenital myotonic dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta* **1453**, 221–229 (1999).
17. Yadava, R. S. *et al.* Modeling muscle regeneration in RNA toxicity mice. *Hum. Mol. Genet.* **30**, 1111–1130 (2021).
18. Dort, J., Fabre, P., Molina, T. & Dumont, N. A. Macrophages Are Key Regulators of Stem Cells during Skeletal Muscle Regeneration and Diseases. *Stem Cells Int.* **2019**, 4761427 (2019).
19. Dufresne, S. S., Frenette, J. & Dumont, N. A. Inflammation et régénération musculaire - Une arme à double tranchant. *médecine/sciences* **32**, 591–597 (2016).

20. Lemos, D. R. *et al.* Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat. Med.* **21**, 786–794 (2015).
21. Mammarella, A. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha and myocardial function in patients with myotonic dystrophy type 1. *J. Neurol. Sci.* **201**, 59–64 (2002)
22. Johansson, A. *et al.* Abnormal cytokine and adrenocortical hormone regulation in myotonic dystrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 3169–3176 (2000).
23. Dort, J. *et al.* Resolvin-D2 targets myogenic cells and improves muscle regeneration in Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Commun.* **12**, 6264 (2021).
24. Basil, M. C. & Levy, B. D. Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 51–67 (2016).
25. Serhan, C. N., Krishnamoorthy, S., Recchiuti, A. & Chiang, N. Novel anti-inflammatory--pro-resolving mediators and their receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* **11**, 629–647 (2011).
26. Serhan, C. N., Chiang, N. & Van Dyke, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 349–361 (2008).
27. Gagnon, C., Mathieu, J. & Noreau, L. Life habits in myotonic dystrophy type 1. *J. Rehabil. Med.* **39**, 560–566 (2007).
28. Mathieu, J., Boivin, H., Meunier, D., Gaudreault, M. & Bégin, P. Assessment of a disease-specific muscular impairment rating scale in myotonic dystrophy. *Neurology* **56**, 336–340 (2001).
29. Petitclerc, É., Hébert, L. J., Mathieu, J., Desrosiers, J. & Gagnon, C. Lower limb muscle strength impairment in late-onset and adult myotonic dystrophy type 1 phenotypes. *Muscle Nerve* **56**, 57–63 (2017).
30. Hogrel, J.-Y. *et al.* Development of a French isometric strength normative database for adults using quantitative muscle testing. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* **88**, 1289–1297 (2007).
31. Bhatnagar, S., Panguluri, S. K. & Kumar, A. Gene Profiling Studies in Skeletal Muscle by Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. in *Myogenesis: Methods and Protocols* (ed. DiMario, J. X.) 311–324 (Humana Press, 2012). doi:10.1007/978-1-61779-343-1_18.
32. Dumont, N. A. & Rudnicki, M. A. Characterizing Satellite Cells and Myogenic Progenitors During Skeletal Muscle Regeneration. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1560**, 179–188 (2017).
33. Comprehensive Integration of Single-Cell Data - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31178118/>.
34. Md, L. & Fj, T. Current best practices in single-cell RNA-seq analysis: a tutorial. *Mol. Syst. Biol.* **15**, (2019).
35. Todd, J., Simpson, P., Estis, J., Torres, V. & Wub, A. H. B. Reference range and short- and long-term biological variation of interleukin (IL)-6, IL17A and tissue necrosis factor-alpha using high sensitivity assays. *Cytokine* **64**, 660–665 (2013).
36. Bonetto, A. *et al.* JAK/STAT3 pathway inhibition blocks skeletal muscle wasting downstream of IL6 and in experimental cancer cachexia. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **303**, E410-421 (2012).
37. Webster, J. M., Kempen, L. J. A. P., Hardy, R. S. & Langen, R. C. J. Inflammation and Skeletal Muscle Wasting During Cachexia. *Front. Physiol.* **11**, 597675 (2020).
38. Pan, L. *et al.* Inflammation and sarcopenia: A focus on circulating inflammatory cytokines. *Exp. Gerontol.* **154**, 111544 (2021).
39. Villalta, S. A., Nguyen, H. X., Deng, B., Gotoh, T. & Tidball, J. G. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the

- severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 482–496 (2009).
40. Mojumdar, K. *et al.* Inflammatory monocytes promote progression of Duchenne muscular dystrophy and can be therapeutically targeted via CCR2. *EMBO Mol. Med.* **6**, 1476–1492 (2014).
 41. Arnold, L. *et al.* Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* **204**, 1057–1069 (2007).
 42. High-Dimensional Single-Cell Quantitative Profiling of Skeletal Muscle Cell Population Dynamics during Regeneration - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32708412/>.
 43. Juban, G. *et al.* AMPK Activation Regulates LTBP4-Dependent TGF- β 1 Secretion by Pro-inflammatory Macrophages and Controls Fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy. *Cell Rep.* **25**, 2163-2176.e6 (2018).
 44. Nicholas, J. *et al.* Time course of chemokine expression and leukocyte infiltration after acute skeletal muscle injury in mice. *Innate Immun.* **21**, 266–274 (2015).
 45. Proost, P., Wuyts, A. & van Damme, J. The role of chemokines in inflammation. *Int. J. Clin. Lab. Res.* **26**, 211–223 (1996).
 46. Fernando, M. R., Reyes, J. L., Iannuzzi, J., Leung, G. & McKay, D. M. The pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages. *PLoS One* **9**, e94188 (2014).
 47. Mauer, J. *et al.* Signaling by IL6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nat. Immunol.* **15**, 423–430 (2014).
 48. Kratochvill, F. *et al.* TNF Counterbalances the Emergence of M2 Tumor Macrophages. *Cell Rep.* **12**, 1902–1914 (2015).
 49. Cytokines and Chemokines as Regulators of Skeletal Muscle Inflammation: Presenting the Case of Duchenne Muscular Dystrophy. <https://www.hindawi.com/journals/mi/2013/540370/>.
 50. Langen, R. C. J. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **18**, 227–237 (2004).
 51. Guttridge, D. C., Mayo, M. W., Madrid, L. V., Wang, C. Y. & Baldwin, A. S. NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science* **289**, 2363–2366 (2000).
 52. Girardi, F. *et al.* TGF β signaling curbs cell fusion and muscle regeneration. *Nat. Commun.* **12**, 750 (2021).
 53. Melendez, J. *et al.* TGF β signalling acts as a molecular brake of myoblast fusion. *Nat. Commun.* **12**, 749 (2021).
 54. Beaulieu, D. *et al.* Abnormal prostaglandin E2 production blocks myogenic differentiation in myotonic dystrophy. *Neurobiol. Dis.* **45**, 122–129 (2012).
 55. Alvarez, A. M., DeOcesano-Pereira, C., Teixeira, C. & Moreira, V. IL1 β and TNF- α Modulation of Proliferated and Committed Myoblasts: IL6 and COX-2-Derived Prostaglandins as Key Actors in the Mechanisms Involved. *Cells* **9**, E2005 (2020).
 56. Steyn, P. J., Dzobo, K., Smith, R. I. & Myburgh, K. H. Interleukin-6 Induces Myogenic Differentiation via JAK2-STAT3 Signaling in Mouse C2C12 Myoblast Cell Line and Primary Human Myoblasts. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, E5273 (2019).
 57. Serhan, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* **510**, 92–101 (2014).
 58. Giannakis, N. *et al.* Dynamic lipid mediator changes support macrophage subtype

- transitions during muscle regeneration. *Nat. Immunol.* **20**, 626–636 (2019).
59. Markworth, J. F. *et al.* Resolvin D1 supports skeletal myofiber regeneration via actions on myeloid and muscle stem cells. *JCI Insight* **5**, e137713.
60. Markworth, J. F. *et al.* Metabolipidomic profiling reveals an age-related deficiency of skeletal muscle pro-resolving mediators that contributes to maladaptive tissue remodeling. *Aging Cell* **20**, e13393 (2021).
61. Ge, Y., Waldemer, R. J., Nalluri, R., Nuzzi, P. D. & Chen, J. RNAi screen reveals potentially novel roles of cytokines in myoblast differentiation. *PloS One* **8**, e68068 (2013).
62. Ono, Y. & Sakamoto, K. Lipopolysaccharide inhibits myogenic differentiation of C2C12 myoblasts through the Toll-like receptor 4-nuclear factor- κ B signaling pathway and myoblast-derived tumor necrosis factor- α . *PloS One* **12**, e0182040 (2017).
63. Lawrence, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a001651 (2009).
64. Li, R. *et al.* Maresin 1 Mitigates Inflammatory Response and Protects Mice from Sepsis. *Mediators Inflamm.* **2016**, 3798465 (2016).
65. Bakkar, N. & Guttridge, D. C. NF- κ B Signaling: A Tale of Two Pathways in Skeletal Myogenesis. *Physiol. Rev.* **90**, 495–511 (2010).
66. Acharyya, S. *et al.* Interplay of IKK/NF-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* **117**, 889–901 (2007).
67. Heckmatt, J. Z., Moosa, A., Hutson, C., Maunder-Sewry, C. A. & Dubowitz, V. Diagnostic needle muscle biopsy. A practical and reliable alternative to open biopsy. *Arch. Dis. Child.* **59**, 528–532 (1984).
68. Sasarman, F., Karpati, G. & Shoubridge, E. A. Nuclear genetic control of mitochondrial translation in skeletal muscle revealed in patients with mitochondrial myopathy. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1669–1681 (2002).
69. Bhatnagar, S., Panguluri, S. K. & Kumar, A. Gene Profiling Studies in Skeletal Muscle by Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. in *Myogenesis: Methods and Protocols* (ed. DiMario, J. X.) 311–324 (Humana Press, 2012). doi:10.1007/978-1-61779-343-1_18.
70. Dumont, N. A. & Rudnicki, M. A. Characterizing Satellite Cells and Myogenic Progenitors During Skeletal Muscle Regeneration. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1560**, 179–188 (2017).
71. Alexander MS, Rozkalne A, Colletta A, et al. CD82 Is a Marker for Prospective Isolation of Human Muscle Satellite Cells and Is Linked to Muscular Dystrophies. *Cell Stem Cell.* 2016;19(6):800-807. doi:10.1016/j.stem.2016.08.006
72. Gagnon, C. *et al.* A 9-year follow-up study of quantitative muscle strength changes in myotonic dystrophy type 1. *J. Neurol.* **265**, 1698–1705 (2018).
73. Bergstrom, j. Muscle electrolytes in man determined by neutron activation analysis on needle biopsy specimens. *Scandinave Journal of Clinical and Laboratory Investigation Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation.* Vol4, 1-110. (1962).

Chapitre 4 : Discussion

Les études confirmant un profil inflammatoire systémique et locale plus élevé dans les maladies dystrophiques sont de plus en plus nombreuses. À la lumière de celles-ci, il devenait intéressant d'évaluer si un tel profil inflammatoire était également présent chez les patients atteints de DM1. Notre étude a permis de confirmer cette hypothèse en démontrant la présence d'un profil inflammatoire élevé au niveau systémique, local et cellulaire. Par le biais de ces résultats, cette étude a permis d'améliorer les connaissances relatives à la DM1 en complétant certaines des quelques études publiées sur le sujet. Notamment, une étude portant sur le système cardiaque en DM1 ayant démontré la présence d'un profil inflammatoire élevé au niveau systémique en raison de la présence élevée des cytokines pro-inflammatoires TNF α et IL6.⁴⁴ Dans notre étude, le niveau de ces deux cytokines a également été démontré comme étant élevé chez les patients DM1. Ce résultat permet de corréliser la perte de la force musculaire et la présence d'une inflammation systémique chez les patients DM1. Cependant la source de l'inflammation reste méconnue et celles-ci peut aussi bien provenir du muscle que d'autres organes tels que le cœur et le cerveau également touché par cette maladie multisystémique. Notre étude apporte cependant de nouvelles informations puisqu'elle est la première à démontrer la présence d'un processus inflammatoire au niveau du tissu musculaire. En effet, la présence anormalement élevée de macrophages dans les tissus musculaires de patients DM1 a permis d'élaborer plusieurs hypothèses. La première étant que les macrophages pro-inflammatoires présents dans ces tissus sont responsables de l'inflammation chronique déjà démontrée en dystrophie musculaire.⁵⁸ La seconde est que les macrophages pourraient acquérir un phénotype dit hybride en produisant à la fois des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires.⁶⁷ Considérant que la résolution de l'inflammation s'effectue selon un décours temporel très précis, les signaux contradictoires lancés par la présence simultanée de macrophages pro- et anti-inflammatoires pourraient être à l'origine d'une inflammation chronique. De plus, en adoptant ce phénotype hybride, les macrophages anti-inflammatoires pourraient perdre leur phénotype pro-résolution. Après avoir mesuré l'inflammation aux niveaux systémique et tissulaire, nous nous sommes intéressés à la présence de cette inflammation au niveau cellulaire puisque les cellules satellites sont affectées en DM1.⁹³ L'hypothèse

était que l'inflammation pourrait être présente au niveau cellulaire et ainsi altérer le processus de myogenèse. Nos recherches ont permis de confirmer cette hypothèse puisque nous avons démontré que les cellules myogéniques issues de patients DM1 expriment exclusivement des gènes de l'inflammation en comparaison à des cellules issues de sujets sains. Ces résultats, obtenus au niveau cellulaire, permettent de confirmer la présence d'un profil inflammatoire dans le muscle squelettique en DM1.

Nous nous sommes attardés sur la caractérisation des cellules myogéniques dans ce projet, cependant, puisque la DM1 est une maladie multi systémique, d'autres types cellulaires pourraient être affectés. Ainsi, il serait intéressant d'observer si des cellules ayant un rôle important dans la production de médiateurs inflammatoires, comme les macrophages ou les progéniteurs fibro-adipogéniques, sont aussi affectés dans la maladie. Une expérience de séquençage d'ARN sur cellules uniques sur l'ensemble des populations cellulaires isolées de biopsies musculaires pourrait permettre de démontrer si d'autres populations cellulaires présentent un profil pro-inflammatoire.

Après avoir démontré la présence de l'inflammation, nous nous sommes intéressés aux stratégies d'atténuation de celle-ci. De plus en plus d'études scientifiques ont démontré l'efficacité des médiateurs lipidiques pour résoudre l'inflammation. Notre étude a permis d'enrichir ces évidences puisqu'elle a démontré l'efficacité de la RvD2 et de la MR2 à atténuer l'inflammation et à améliorer certaines étapes altérées de la myogenèse documentée en DM1. En effet, ces médiateurs ont permis de diminuer l'expression de certains gènes de l'inflammation exprimés exclusivement par les cellules de patients dont TNF α , IL6 et IL1. De plus, ces médiateurs ont agi sur la myogenèse en stimulant la prolifération et la différenciation des CSM, deux étapes du processus myogénique affectées en DM1.^{55 56} Ces conclusions sont en lien avec la littérature puisqu'une étude a récemment démontré l'efficacité de la RvD2 à diminuer l'inflammation dans un modèle de souris *mdx* en diminuant notamment l'expression du gène TNF α .⁸⁷ Celle-ci agit également sur la myogenèse en stimulant la différenciation via sa liaison à son récepteur gpr18.⁸⁷ Nos résultats suggèrent quant à eux qu'en diminuant l'inflammation, la RvD2 influence positivement la prolifération et la différenciation des cellules satellites. En améliorant la capacité myogénique de ces cellules, de nouvelles myofibrilles pourront subséquemment être formées et l'atrophie et la faiblesse musculaire pourront ainsi être freinées.

Notre étude a ainsi permis de mettre en évidence l'efficacité des médiateurs lipidiques dans un contexte de maladie neuromusculaire. Cependant, l'efficacité de ces médiateurs a déjà été démontrée dans d'autres maladies, notamment dans la septicémie bactérienne où la RvD2 a permis de diminuer la quantité de bactéries présentes dans le sang en plus de diminuer l'expression de cytokines pro-inflammatoires.⁹⁴ La RvD1 est aussi efficace pour lutter contre la polyarthrite rhumatoïde en atténuant la sévérité de l'arthrite, le niveau d'inflammation via la diminution de PGE2 tout en stimulant l'expression des gènes liés à la synthèse du cartilage.⁹⁵ Finalement, la RvD1, un autre médiateur de la famille des résolvines a démontré son efficacité à atténuer l'inflammation en réduisant l'expression de l'IL23 responsable en partie de l'inflammation allergique des voies respiratoires.⁹⁶

L'ensemble de ces études, dont la nôtre, permettent de démontrer le potentiel thérapeutique des médiateurs à atténuer l'inflammation au sein de différentes maladies, mais également d'agir sur la myogenèse en ciblant les fonctions des cellules souches musculaires. En DM1, ces médiateurs pourraient diminuer l'inflammation, restaurer le processus de myogenèse et donc améliorer la force musculaire des personnes atteintes.

4.1 Limites de l'étude

La principale limite de l'étude scientifique présentée dans ce mémoire de maîtrise se trouve dans le nombre de participants. La DM1 étant une maladie rare, l'accès au matériel biologique est restreint. Malgré cette limite, à notre connaissance, notre échantillon est parmi l'un des plus grands au monde. Parmi les lignées utilisées, il y a énormément de variabilité, car elles sont issues de patients différents. En effet, ces individus sont différents au niveau du sexe, de l'âge et plus important encore, au niveau du nombre de répétitions CTG et du phénotype clinique. Ces différences au niveau des répétitions sont d'autant plus marquées par le phénomène de mosaïque somatique vu que le nombre de répétitions change d'une cellule à une autre et augmente au cours de la vie de chaque patient. L'ensemble de ces différences entraîne une variabilité dans nos résultats et il est fort probable que certains d'entre eux auraient pu être significatifs en incluant un plus grand nombre d'individus dans nos expériences. Aussi, avec un plus grand nombre de participants, des sous-groupes auraient pu être établis en fonction de certaines variables

clés de la maladie telles que le sexe, l'âge et le phénotype.¹⁵ Cependant, même avec un nombre de participants limité, nous avons pu apporter de nouvelles connaissances et surtout un traitement prometteur pour la DM1.

4.2 Perspectives

Les perspectives de ce projet sont très nombreuses afin de mieux comprendre nos résultats et les mécanismes d'actions des médiateurs lipidiques sur l'inflammation et le processus myogénique. Premièrement, nous avons démontré un profil inflammatoire augmenté en DM1 et que les médiateurs lipidiques étaient des molécules prometteuses pour diminuer l'inflammation. En effet, la RvD2 et la MR2 ont permis de réduire le niveau d'expression des gènes de l'inflammation, mais leur effet demeure inconnu au niveau protéique. Ainsi, il serait intéressant de traiter les cellules et d'observer via des ELISA ou un test multiplex si l'ajout exogène de médiateurs permet également de diminuer l'expression des protéines de l'inflammation. De plus, la RvD2 et la MR2 ont stimulé la prolifération et la différenciation *in vitro*, mais il serait intéressant de confirmer ces résultats dans un modèle animal (souris atteintes de DM1 [DMSXL]). Ainsi, il serait possible de vérifier si l'injection *in vivo* de ces médiateurs stimule la prolifération et la différenciation des CSM et ce traitement diminue l'atrophie et augmente la force musculaire. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les souris traitées devraient présenter un nombre plus grand de myofibres et une force musculaire plus élevée que les souris non traitées.

Ensuite, afin de mieux comprendre comment la RvD2 et la MR2 fonctionnent, nous pourrions nous intéresser à leur récepteur et étudier leur mécanisme d'action. Pour cela, un agoniste de chaque récepteur pourrait être utilisé pour traiter les cellules. Ainsi, si par exemple, le traitement avec l'agoniste du récepteur gpr18 stimule également la prolifération et la différenciation des CSM, ceci voudrait dire que les effets de la RvD2 sont liés à l'activation du récepteur gpr18 exprimé par les cellules satellites pour rétablir leurs fonctions.

Enfin, plusieurs nouvelles études pourraient nous aider à mieux comprendre certaines facettes de la maladie encore peu connues, notamment au niveau des voies de

signalisation. Certaines de celles-ci sont responsables de la dégradation des protéines et de l'atrophie musculaire, notamment le système ubiquitine-proteasome où il serait intéressant d'étudier son mécanisme d'action au niveau de l'atrophie.⁹⁷ Mais également, au niveau de la voie de signalisation de NF- κ B qui agit sur TNF α afin d'inhiber la différenciation cellulaire.⁴² Considérant que la RvD2 permet de diminuer l'expression de TNF α et de stimuler la différenciation peut être que ce médiateur agit sur la voie de signalisation NF- κ B pour agir au niveau de l'inflammation et des cellules.

Conclusion

Les objectifs de recherche présentés dans ce mémoire étaient de démontrer la présence d'un profil inflammatoire jusqu'ici présent peu documenté en DM1 et d'explorer les effets d'un traitement prometteur pour cibler ce processus via l'utilisation de médiateurs pro-résolution. Le premier objectif a été rempli en démontrant la présence d'un profil inflammatoire plus élevé aux niveaux sanguin, tissulaire et cellulaire chez les individus atteints de DM1. Ces résultats sont en lien avec les nombreuses observations similaires retrouvées en dystrophie musculaire. Ensuite, l'utilisation de médiateurs lipidiques a permis de démontrer leur efficacité pour atténuer l'inflammation locale en DM1 permettant ainsi d'affirmer que ces médiateurs possèdent de réels potentiels thérapeutiques pour atténuer l'inflammation et améliorer la myogenèse en DM1. La restauration du processus de myogenèse permettrait de fusionner avec les fibres musculaires déjà présentes et donc d'améliorer la force musculaire des personnes atteintes.

Références

1. Harper PS. *Myotonic Dystrophy*, 3rd ed, WB Saunders, London 2001.
2. Myotonic dystrophy, 3rd edition: major problems in neurology series, No 37 | Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry. <https://jnnp.bmj.com/content/72/3/422.2>.
3. Thornton, C. A. Myotonic Dystrophy. *Neurol. Clin.* **32**, 705–719 (2014).
4. Bouchard, G., Roy, R., Declos, M., Mathieu, J. & Kouladjian, K. Origin and diffusion of the myotonic dystrophy gene in the Saguenay region (Quebec). *Can. J. Neurol. Sci. J. Can. Sci. Neurol.* **16**, 119–122 (1989).
5. Yotova, V. *et al.* Anatomy of a founder effect: Myotonic dystrophy in Northeastern Quebec. *Hum. Genet.* **117**, 177–87 (2005).
6. Fu, Y.-H. *et al.* An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* **255**, 1256–8 (1992).
7. Shaw, D. J. *et al.* A study of DNA methylation in myotonic dystrophy. *J. Med. Genet.* **30**, 189–192 (1993).
8. De Antonio, M. *et al.* Unravelling the myotonic dystrophy type 1 clinical spectrum: A systematic registry-based study with implications for disease classification. *Rev. Neurol. (Paris)* **172**, 572–580 (2016).
9. Bird, T. D. Myotonic Dystrophy Type 1. in *GeneReviews®* (eds. Adam, M. P. *et al.*) (University of Washington, Seattle, 1993).
10. Molecular Genetics and Genetic Testing in Myotonic Dystrophy Type 1. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/391821/>.
11. A, H. *et al.* The correlation of age of onset with CTG trinucleotide repeat amplification in myotonic dystrophy. *J. Med. Genet.* **29**, 774–779 (1992).
12. Zaki, M., Boyd, P. A., Impey, L., Roberts, A. & Chamberlain, P. Congenital myotonic dystrophy: prenatal ultrasound findings and pregnancy outcome. *Ultrasound Obstet. Gynecol. Off. J. Int. Soc. Ultrasound Obstet. Gynecol.* **29**, 284–288 (2007).
13. Echenne, B. & Bassez, G. Congenital and infantile myotonic dystrophy. *Handb. Clin. Neurol.* **113**, 1387–1393 (2013).
14. Thornton, C. A., Johnson, K. & Moxley, R. T. Myotonic dystrophy patients have larger CTG expansions in skeletal muscle than in leukocytes. *Ann. Neurol.* **35**, 104–107 (1994).
15. Dogan, C. *et al.* Gender as a Modifying Factor Influencing Myotonic Dystrophy Type 1 Phenotype Severity and Mortality: A Nationwide Multiple Databases Cross-Sectional Observational Study. *PLoS ONE* **11**, (2016).
16. Myotonia congenita and myotonic dystrophy: descriptive epidemiological investigation in Turin, Italy (1955-1979) - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7161034/>.
17. Timchenko, L. Molecular mechanisms of muscle atrophy in myotonic dystrophies. (2013).
18. Suenaga, K. *et al.* Muscleblind-like 1 knockout mice reveal novel splicing defects in the myotonic dystrophy brain. *PloS One* **7**, e33218 (2012).
19. Ward, A. J., Rimer, M., Killian, J. M., Dowling, J. J. & Cooper, T. A. CUGBP1 overexpression in mouse skeletal muscle reproduces features of myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 3614–3622 (2010).
20. Zhang, L., Lee, J., Wilusz, J. & Wilusz, C. The RNA-binding protein CUGBP1 regulates stability of tumor necrosis factor mRNA in muscle cells: Implications for myotonic dystrophy. *J. Biol. Chem.* **283**, 22457–63 (2008).
21. Mastroiannopoulos, N. P., Shammas, C. & Phylactou, L. A. Tackling the

- pathogenesis of RNA nuclear retention in myotonic dystrophy. *Biol. Cell* **102**, 515–523 (2010).
22. Mateos-Aierdi, A. J. *et al.* Muscle wasting in myotonic dystrophies: a model of premature aging. *Front. Aging Neurosci.* **7**, 125 (2015).
 23. Wang, Y. H., Amirhaeri, S., Kang, S., Wells, R. D. & Griffith, J. D. Preferential nucleosome assembly at DNA triplet repeats from the myotonic dystrophy gene. *Science* **265**, 669–671 (1994).
 24. Klesert, T. R., Otten, A. D., Bird, T. D. & Tapscott, S. J. Trinucleotide repeat expansion at the myotonic dystrophy locus reduces expression of DMAHP. *Nat. Genet.* **16**, 402–406 (1997).
 25. (PDF) Myotonic Dystrophy Is Associated with a Reduced Level of RNA from the DMWD Allele Adjacent to the Expanded Repeat. https://www.researchgate.net/publication/12898312_Myotonic_Dystrophy_Is_Associated_with_a_Reduced_Level_of_RNA_from_the_DMWD_Allele_Adjacent_to_the_Expanded_Repeat.
 26. Klesert, T. R. *et al.* Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy. *Nat. Genet.* **25**, 105–109 (2000).
 27. Wakimoto, H. *et al.* Characterization of cardiac conduction system abnormalities in mice with targeted disruption of Six5 gene. *J. Interv. Card. Electrophysiol. Int. J. Arrhythm. Pacing* **7**, 127–135 (2002).
 28. Satellite cell dysfunction contributes to the progressive muscle atrophy in myotonic dystrophy type 1 - Thornell - 2009 - Neuropathology and Applied Neurobiology - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2990.2009.01014.x>.
 29. Excitation Contraction Coupling - an overview | ScienceDirect Topics. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/excitation-contraction-coupling>.
 30. Relaix, F. & Zammit, P. S. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development* **139**, 2845–2856 (2012).
 31. Tajbakhsh, S. Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. *J. Intern. Med.* **266**, 372–389 (2009).
 32. Essén, B., Jansson, E., Henriksson, J., Taylor, A. W. & Saltin, B. Metabolic characteristics of fibre types in human skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* **95**, 153–165 (1975).
 33. Bodine, S. C. *et al.* Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* **294**, 1704–1708 (2001).
 34. Frontera, W. R. & Ochala, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif. Tissue Int.* **96**, 183–195 (2015).
 35. Doucet, M. *et al.* Muscle atrophy and hypertrophy signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **176**, 261–269 (2007).
 36. Bodine, S. C. *et al.* Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat. Cell Biol.* **3**, 1014–1019 (2001).
 37. Rommel, C. *et al.* Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat. Cell Biol.* **3**, 1009–1013 (2001).
 38. Baker, J., Liu, J. P., Robertson, E. J. & Efstratiadis, A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* **75**, 73–82 (1993).

39. Coleman, M. E. *et al.* Myogenic Vector Expression of Insulin-like Growth Factor I Stimulates Muscle Cell Differentiation and Myofiber Hypertrophy in Transgenic Mice *. *J. Biol. Chem.* **270**, 12109–12116 (1995).
40. Nieuwenhuis, S. *et al.* Insulin Signaling as a Key Moderator in Myotonic Dystrophy Type 1. *Front. Neurol.* **10**, 1229 (2019).
41. Flanagan-Steet, H., Hannon, K., McAvoy, M. J., Hullinger, R. & Olwin, B. B. Loss of FGF receptor 1 signaling reduces skeletal muscle mass and disrupts myofiber organization in the developing limb. *Dev. Biol.* **218**, 21–37 (2000).
42. Guttridge, D. C., Mayo, M. W., Madrid, L. V., Wang, C. Y. & Baldwin, A. S. NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science* **289**, 2363–2366 (2000).
43. Langen, R. C. J. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **18**, 227–237 (2004).
44. Mammarella, A. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha and myocardial function in patients with myotonic dystrophy type 1. *J. Neurol. Sci.* **201**, 59–64 (2002).
45. Mauro, A. SATELLITE CELL OF SKELETAL MUSCLE FIBERS. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 493–495 (1961).
46. Blau, H. M., Brazelton, T. R. & Weimann, J. M. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* **105**, 829–841 (2001).
47. Asakura, A., Komaki, M. & Rudnicki, M. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differ. Res. Biol. Divers.* **68**, 245–253 (2001).
48. Yin, H., Price, F. & Rudnicki, M. A. Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *Physiol. Rev.* **93**, 23–67 (2013).
49. Seale, P. *et al.* Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* **102**, 777–786 (2000).
50. Feichtinger, R. G. *et al.* Biallelic variants in the transcription factor PAX7 are a new genetic cause of myopathy. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* **21**, 2521–2531 (2019).
51. Crist, C. G., Montarras, D. & Buckingham, M. Muscle satellite cells are primed for myogenesis but maintain quiescence with sequestration of Myf5 mRNA targeted by microRNA-31 in mRNP granules. *Cell Stem Cell* **11**, 118–126 (2012).
52. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17540178/>.
53. Ganassi, M., Badodi, S., Wanders, K., Zammit, P. S. & Hughes, S. M. Myogenin is an essential regulator of adult myofibre growth and muscle stem cell homeostasis. *eLife* **9**, e60445 (2020).
54. Furling, D. *et al.* Defective satellite cells in congenital myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2079–2087 (2001).
55. Bhagavati, S., Bhagwati, S., Shafiq, S. A. & Xu, W. (CTG)_n repeats markedly inhibit differentiation of the C2C12 myoblast cell line: implications for congenital myotonic dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta* **1453**, 221–229 (1999).
56. Overexpression of 3'-Untranslated Region of the Myotonic Dystrophy Kinase cDNA Inhibits Myoblast Differentiation in Vitro * - Journal of Biological Chemistry. [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)89803-4/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)89803-4/fulltext).
57. Furling, D., Lemieux, D., Taneja, K. & Puymirat, J. Decreased levels of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and delayed differentiation in human myotonic dystrophy myoblasts. *Neuromuscul. Disord. NMD* **11**, 728–735 (2001).
58. Dufresne, S. S., Frenette, J. & Dumont, N. A. Inflammation et régénération

- musculaire - Une arme à double tranchant. *médecine/sciences* **32**, 591–597 (2016).
59. Peake, J., Nosaka, K. & Suzuki, K. Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *Exerc. Immunol. Rev.* **11**, 64–85 (2005).
60. MacIntyre, D. L., Reid, W. D., Lyster, D. M. & McKenzie, D. C. Different effects of strenuous eccentric exercise on the accumulation of neutrophils in muscle in women and men. *Eur. J. Appl. Physiol.* **81**, 47–53 (2000).
61. Gideon, H. P., Phuah, J., Junecko, B. A. & Mattila, J. T. Neutrophils express pro- and anti-inflammatory cytokines in granulomas from Mycobacterium tuberculosis-infected cynomolgus macaques. *Mucosal Immunol.* **12**, 1370–1381 (2019).
62. Rószter, T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm.* **2015**, 816460 (2015).
63. Differentially Activated Macrophages Orchestrate Myogenic Precursor Cell Fate During Human Skeletal Muscle Regeneration - Saclier - 2013 - STEM CELLS - Wiley Online Library.
<https://stemcellsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/stem.1288>.
64. Yao, Y., Xu, X.-H. & Jin, L. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Front. Immunol.* **10**, 792 (2019).
65. Peake, J. M., Neubauer, O., Della Gatta, P. A. & Nosaka, K. Muscle damage and inflammation during recovery from exercise. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **122**, 559–570 (2017).
66. Frontiers | Evolving Roles of Muscle-Resident Fibro-Adipogenic Progenitors in Health, Regeneration, Neuromuscular Disorders, and Aging | Physiology.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2021.673404/full>.
67. Lemos, D. R. *et al.* Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat. Med.* **21**, 786–794 (2015).
68. Johansson, A. *et al.* Abnormal cytokine and adrenocortical hormone regulation in myotonic dystrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 3169–3176 (2000).
69. Shimizu, T. Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **49**, 123–150 (2009).
70. Chiurchiù, V. & Maccarrone, M. Bioactive lipids as modulators of immunity, inflammation and emotions. *Curr. Opin. Pharmacol.* **29**, 54–62 (2016).
71. Arachidonic Acid Cascade and Signal Transduction - Shimizu - 1990 - Journal of Neurochemistry - Wiley Online Library.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1471-4159.1990.tb08813.x>.
72. Flower, R. J. Prostaglandins, bioassay and inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **147 Suppl 1**, S182-192 (2006).
73. Samuelsson, B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* **220**, 568–575 (1983).
74. Badr, K. F., DeBoer, D. K., Schwartzberg, M. & Serhan, C. N. Lipoxin A4 antagonizes cellular and in vivo actions of leukotriene D4 in rat glomerular mesangial cells: evidence for competition at a common receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 3438–3442 (1989).
75. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution | Nature Immunology. https://www.nature.com/articles/ni0701_612.
76. Kohli, P. & Levy, B. D. Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **158**, 960–971 (2009).
77. Serhan, C. N., Krishnamoorthy, S., Recchiuti, A. & Chiang, N. Novel anti-inflammatory--pro-resolving mediators and their receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* **11**,

629–647 (2011).

78. Pirault, J. & Bäck, M. Lipoxin and Resolvin Receptors Transducing the Resolution of Inflammation in Cardiovascular Disease. *Front. Pharmacol.* **9**, 1273 (2018).
79. Doran, A. C., Yurdagul, A. & Tabas, I. Efferocytosis in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 254–267 (2020).
80. Serhan, C. N., Chiang, N. & Van Dyke, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 349–361 (2008).
81. Schwab, J. M., Chiang, N., Arita, M. & Serhan, C. N. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* **447**, 869–874 (2007).
82. Schwab, J. M., Chiang, N., Arita, M. & Serhan, C. N. Resolvin E1 and Protectin D1 Activate Inflammation-Resolution Programs. *Nature* **447**, 869–874 (2007).
83. Kasuga, K. *et al.* Rapid Appearance of Resolvin Precursors in Inflammatory Exudates: Novel Mechanisms in Resolution. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 8677–8687 (2008).
84. Hudert, C. A. *et al.* Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 11276–11281 (2006).
85. Markworth, J. F. *et al.* Metabolipidomic profiling reveals an age-related deficiency of skeletal muscle pro-resolving mediators that contributes to maladaptive tissue remodeling. *Aging Cell* **20**, e13393 (2021).
86. Markworth, J. F. *et al.* Resolvin D1 supports skeletal myofiber regeneration via actions on myeloid and muscle stem cells. *JCI Insight* **5**, e137713.
87. Dort, J. *et al.* Resolvin-D2 targets myogenic cells and improves muscle regeneration in Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Commun.* **12**, 6264 (2021).
88. Serhan, C. N. Novel Lipid Mediators and Resolution Mechanisms in Acute Inflammation. *Am. J. Pathol.* **177**, 1576–1591 (2010).
89. Serhan, C. N. Novel Pro-Resolving Lipid Mediators in Inflammation Are Leads for Resolution Physiology. *Nature* **510**, 92–101 (2014).
90. Levy, B. D. *et al.* Multi-pronged inhibition of airway hyper-responsiveness and inflammation by lipoxin A(4). *Nat. Med.* **8**, 1018–1023 (2002).
91. Arita, M. *et al.* Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 7671–7676 (2005).
92. Duffield, J. S. *et al.* Resolvin D series and protectin D1 mitigate acute kidney injury. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 5902–5911 (2006).
93. Thornell, L.-E. *et al.* Satellite cell dysfunction contributes to the progressive muscle atrophy in myotonic dystrophy type 1. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **35**, 603–613 (2009).
94. Spite, M. *et al.* Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature* **461**, 1287–1291 (2009).
95. JCI Insight - Proresolving and cartilage-protective actions of resolvin D1 in inflammatory arthritis. <https://insight.jci.org/articles/view/85922>.
96. Haworth, O., Cernadas, M., Yang, R., Serhan, C. N. & Levy, B. D. Resolvin E1 regulates interleukin-23, interferon- γ and lipoxin A4 to promote resolution of allergic airway inflammation. *Nat. Immunol.* **9**, 873–879 (2008).
97. Jago, R. T., Lecker, S. H., Gomes, M. & Goldberg, A. L. Patterns of gene expression in atrophying skeletal muscles: response to food deprivation. *FASEB J.* **16**, 1697–1712 (2002).