

Les approches de la recherche en vue d'un traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne

Rapport sur la situation de la recherche au plan international visant à la mise au point d'une thérapie causale de la dystrophie musculaire de Duchenne

Mise à jour: août 2003

Rédigé en collaboration avec des médecins et des scientifiques pour les membres de l'initiative allemande des parents

Aktion Benni & Co

et à l'intention de tous les garçons atteints de la maladie de Duchenne et de leurs familles partout dans le monde

par Guenter Scheuerbrandt, PhD

Ce rapport a été écrit à l'intention des familles qui comptent un ou plusieurs garçons atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne. Il leur explique de façon vulgarisée quelques faits scientifiques de base et leur présente les multiples approches par le biais desquelles la recherche internationale tente de trouver un traitement causal, c'est-à-dire scientifiquement justifié et donc efficace de la maladie. Comme des chercheurs s'affairent, dans plus d'une centaine de laboratoires répartis dans de nombreux pays dans le monde, à trouver un traitement pour cette maladie, nous ne décrivons ici en détail que les plus importants des nombreux résultats obtenus à ce jour. Une série d'autres résultats sont présentés sous une forme très résumée.

La première édition de ce rapport, sortie en 2001, a rassemblé les exposés les plus importants présentés en mai 2000 à l'occasion de la réunion internationale de travail des *National Institutes of Health* à Bethesda près de Washington. **Cette troisième version du rapport a été écrite entre juillet et août 2003**, avant tout sur la base d'informations tirées de publications et de contacts directs avec de nombreux scientifiques.

Introduction

On explique quelques bases scientifiques, ce que sont les gènes, comment ils travaillent, pourquoi la dystrophine est importante, comment des mutations provoquent la dystrophie musculaire de Duchenne et comment la maladie s'acquiert héréditairement.

Les gènes et leur fonction: Les gènes sont des unités fonctionnelles, du matériel génétique contenu dans les chromosomes de chaque cellule. Ce matériel est l'*acide désoxribonucléique*, ou *ADN*. Sa structure ressemble à une échelle torsadée, la *double hélice*. Elle a été découverte en 1953, cela fait 50 ans, par *James Watson* et *Francis Crick*. Les deux montants de l'échelle, ou brins, sont de longues chaînes formées d'acide phosphorique et de désoxyribose, une sorte de sucre. Les barreaux sont constitués de quatre substances chimiques différentes, les *bases* ou *lettres génétiques*: *adénine*, *guanine*, *thymine* et *cytosine*, abrégées en A, G, T et C. Celles-ci se font face par paires dans chaque barreau de la double hélice. Mais, pour des raisons de place, les barreaux ne peuvent contenir que les paires A-T et G-C. Si l'ordre, ou *séquence* de ces *bases* sur l'un des brins est par exemple

---AGGCTTAATCGT---

elle doit alors être

---TCCGAATTAGCA---

sur l'autre. Les séquences des deux brins sont donc *complémentaires* l'une de l'autre.

Chacune des près de 100.000 milliards (100×10^{12}) de cellules du corps humaine in contient 46 chromosomes dans son noyau avec plus de 6 milliards de lettres génétiques regroupées dans 25.000 à 30.000 gènes. Presque toutes les unités de la séquence de ces lettres sont maintenant connues. C'est l'*information génétique* qui se transmet de génération en génération avec très peu de modifications, ou *mutations*. Ces mutations, qui ont été nécessaires au développement de tous les êtres vivants peuvent toutefois apporter avec elles des conséquences négatives comme les maladies héréditaires.

La plupart des gènes portent l'information nécessaire à la construction d'une ou plusieurs protéines qui sont constituées d'acides aminés. La séquence des acides aminés - il en existe 20 différents - est importante pour la fonction des protéines, soit en tant qu'*enzymes* qui contrôlent les processus biochimiques du corps, soit en tant que régulateurs pour d'autres gènes, soit encore comme matériau de structure.

Dans le noyau cellulaire, où résident les chromosomes, l'information génétique est copiée ou *transcrite* et transmise à une autre substance génétique de structure similaire à l'ADN, l'*acide ribonucléique* pré-messager, ou pré-ARNm. Les gènes des organismes multicellulaires sont constitués de sections actives, les *exons*, et de sections inactives, les *introns*. Après la transcription, les introns, qui sont souvent beaucoup plus longs que les exons, sont détachés du pré-ARNm et les exons transcrits sont *épissés* en ARN messager. Celui-ci est ensuite exporté vers les ribosomes, structures de synthèse des protéines situées dans le cytoplasme de la cellule. Dans les ribosomes, des ARN ayant une activité catalytique, les *ribozymes*, utilisent l'information génétique de l'ARNm pour construire des protéines spécifiques à partir d'acides aminés qui sont fournis aux ribosomes par un autre type d'ARN, l'ARN de transfert ou ARNt.

Les ARN utilisent la base U (uracile) au lieu de la base T de l'ADN, très semblable. Dans l'ARNm, trois bases consécutives signifient toujours un des vingt acides aminés différents selon un "dictionnaire", le *code génétique*, qui est le même pour toute vie sur terre. L'écriture génétique n'utilise donc que quatre caractères et ses mots, les *codons*, ont toujours une longueur de trois caractères, qu'on appelle des *triplets*. Un mot suit l'autre sans espace et il existe trois différents *codons stop*, UAA, UAG et UGA qui marquent la fin de la séquence d'une protéine.

Le gène de la dystrophine: La dystrophie musculaire de Duchenne est une des maladies héréditaires les plus fréquentes. Un garçon sur 3.500 environ naît avec cette maladie. Elle est causée par une *mutation*, ou altération du *gène de la dystrophine* avec pour conséquence que cette protéine, la *dystrophine*, n'est plus du tout présente dans leurs cellules musculaires, ou alors à l'état de traces.

Le gène de la dystrophine a été *identifié* en 1986 sur le chromosome X (*Kunkel*, Boston) et peu de temps après, c'est sa structure qui était élucidée (*Hoffman*, Washington). Avec ses 2,6 millions de paires de bases, il est le gène humain le plus long. Cependant, 13.993 paires de bases (soit 0,5%) appartiennent aux 79 exons du gène et contiennent ensemble la séquence codante active, c'est-à-dire l'information nécessaire à la synthèse des différentes formes de la protéine *dystrophine*. La transcription de l'information génétique du gène de la dystrophine dans le pré-ARNm est contrôlée par cinq régions de l'ADN, les *promoteurs*, qui dirigent le processus d'épissage de sorte qu'un certain nombre de protéines différentes soit produit. Le produit principal est la dystrophine entière, une très longue protéine en forme de bâtonnet, constituée de 3.685 acides aminés.

La dystrophine se trouve dans les costamères qui relient la région Z des *sarcomères*, les structures contractiles, avec le *sarcolemme*, la membrane cellulaire, et qui sont nécessaires à la transmission de l'effort. Elle joue donc un rôle important dans la stabilité mécanique des cellules musculaires durant la contraction musculaire.

Le complexe de la dystrophine: La dystrophine fait partie d'un réseau de protéines nombreuses et variées dont plus de 50 sont aujourd'hui connues. On trouve parmi elles le dystroglycane et le sarcoglycane, la syntrophine et l'intégrine, la dystrobrevine, la nitrique oxyde synthase, ainsi que d'autres composés comme la dysferline, le sarcospan, la laminine, la cavéoline, la téléthonine, la myotoline, l'agrine, la neurexine, la desmusline, la syncoïline, la fukutine, l'aquaporine, la spectrine, le collagène, la calpaïne, etc. A l'avenir, on s'attend à identifier encore d'autres composants (*Campbell*, Iowa City).

Lorsque la dystrophine est absente, l'équilibre entre les diverses parties du complexe est perturbé. En particulier, les dystroglycanes, les sarcoglycanes et le sarcospan sont réduits ou disparaissent

complètement. Chacune des protéines du complexe a son propre gène, qui peut aussi être altéré par des mutations. Ceci est à l'origine des 13 dystrophies des ceintures et des 5 dystrophies musculaires congénitales connues à l'heure actuelle, ainsi que de 8 autres maladies neuromusculaires au moins.

Quelle est la taille des molécules, de l'ADN et de la dystrophine? Le grand public n'a que rarement une idée correcte de la taille des structures moléculaires avec lesquelles travaillent les scientifiques.

L'expérience de pensée suivante démontre la petitesse d'une simple molécule. Versez le quart d'un litre de vin dans la Méditerranée au niveau du Déroit de Gibraltar. Puis mélangez bien la Méditerranée et, à l'autre bout, à Alexandrie, prélevez un quart de litre d'eau au moyen du même verre à vin. Combien de molécules d'alcool trouverez-vous dans ce verre? Vingt-deux millions!

La double hélice de l'ADN a un diamètre de deux nanomètres, soit deux millièmes de millimètre. Si on agrandissait l'hélice pour qu'elle ait un diamètre d'un centimètre, quelle taille atteindrait une personne de 1,80 m si on l'agrandissait du même facteur? Neuf mille kilomètres, c'est-à-dire à peu près la distance de l'Europe à la Floride.

Chaque noyau cellulaire des quelque 100.000 milliards (100×10^{12}) de cellules que compte un être humain adulte, contient le matériel génétique complet fait de 6 milliards de paires de bases. L'ADN total qui se trouve dans l'ensemble des chromosomes d'un seul noyau de cellule fait deux mètres de long!

Chaque molécule de dystrophine fait 125 nanomètres, donc 80.000 d'entre elles étalées en ligne droite couvriraient juste un centimètre. Il y a 114 milliards de molécules de dystrophine et le même nombre de complexes de dystrophine dans un gramme de muscle.

Mutation et étiologie de la maladie: La dystrophie musculaire de Duchenne est causée par trois types différents de mutations du gène de la dystrophine: des délétions, s'il manque certaines parties du gène, des duplications, si certaines parties sont dupliquées, et des mutations ponctuelles, si des lettres génétiques isolées sont échangées, éliminées ou ajoutées. Comme le mécanisme de lecture des ribosomes lit toujours les mots de code de trois lettres l'un après l'autre, sans espaces, une mutation ne bouleverse pas le cadre de lecture si le nombre de lettres manquantes ou ajoutées est divisible par trois sans reste. Dans ce cas, la dystrophine produite est plus courte ou plus longue. Si cette modification ne concerne que des structures non essentielles de la dystrophine, par exemple la partie centrale, la molécule peut encore être partiellement fonctionnelle. C'est la forme bénigne de la dystrophie, la *dystrophie musculaire de Becker*, qui se développe alors.

Si la mutation déplace le cadre de lecture d'une ou deux lettres, alors, dans la plupart des cas, une série entière d'acides aminés incorrects est incorporée dans la protéine à partir du site de la mutation, jusqu'à ce que survienne finalement un nouveau codon stop prématuré qui met un terme à la synthèse. Dans ce cas, la dystrophine incomplète ne peut pas remplir sa fonction normale, elle est dégradée et se développe alors la *dystrophie musculaire de Duchenne*.

En l'absence de dystrophine, les cellules musculaires dégénèrent. Elles sont constamment régénérées, mais le mécanisme de régénération finit par ne plus fonctionner. Les fibres musculaires détruites sont remplacées par de la graisse et du tissu conjonctif, ce qui provoque, à l'âge de deux ou trois ans, les premiers signes visibles de la maladie.

A l'endroit où les motoneurons entrent en contact avec la membrane musculaire, il se trouve une autre protéine, l'*utrophine*, dont la structure est similaire à celle de la dystrophine et qui contribue dans une certaine mesure à maintenir la stabilité de la membrane musculaire (Davies, Oxford). Sans utrophine, la maladie progresserait beaucoup plus vite.

Hérédité de la dystrophie musculaire de Duchenne: Outre les 44 chromosomes normaux, appelés *autosomes*, les garçons ont deux chromosomes sexuels différents dans chacune de leurs cellules, un chromosome Y et un chromosome X. Si leur gène de la dystrophine, situé sur leur unique chromosome X, est endommagé par une mutation, celle-ci ne peut pas être compensée par un gène intact situé sur un second chromosome X, comme cela est possible pour les mutations survenant sur les autosomes, qui vont toujours par paires. C'est pourquoi la dystrophie de Duchenne et de Becker n'affectent *que les garçons*.

En revanche, les femmes possèdent deux chromosomes X dans leurs cellules. Si elles portent un gène de la dystrophine muté sur l'un de leurs chromosomes X, elles sont capables de transmettre la maladie, elles sont ce que l'on appelle des *porteurs génétiques*. Comme l'un des chromosomes X est inactivé, son choix étant le fruit du hasard, seule la moitié environ des noyaux de leurs cellules

musculaires ont un gène de la dystrophine intact. Ceci suffit à ne provoquer soit aucun symptôme, soit de faibles symptômes cliniques de la maladie.

Environ deux tiers des garçons atteints de maladie de Duchenne héritent leur maladie parce que leur mère est un *porteur génétique*. A la méiose, division cellulaire menant à la formation des ovules, chaque ovule reçoit un seul chromosome X. La probabilité qu'il s'agisse du chromosome X portant la mutation du gène est de 50%. Par conséquent, en moyenne, 50% de ses fils auront la dystrophie musculaire de Duchenne et 50% de ses filles seront à nouveau porteuses de la mutation. Ce risque reste le même pour tous les enfants d'une même famille, il ne diminue pas si la famille a déjà un enfant atteint de la dystrophie musculaire de Duchenne.

Si la mère est porteuse, la mutation est apparue soit dans les cellules germinales de ses parents ou dans celles de ses ancêtres. Toutes les cellules du corps d'un porteur génétique possédant le gène muté, son statut de porteur peut être détecté par une analyse du gène dans les leucocytes ou globules blancs du sang, qui contiennent des chromosomes.

Environ un quart des cas sont causés par une nouvelle mutation. Dans ces cas, la mutation est survenue spontanément dans l'ovule particulier de la mère qui est ensuite devenu le patient. Comme un seul ovule a été affecté, les autres enfants de ces femmes ne sont pas exposés à un risque supérieur à celui du risque général de présenter la maladie.

Environ un dixième des patients ont une mère présentant une *mosaïque de cellules germinales*, due au fait que la nouvelle mutation est apparue précocement durant la formation des cellules germinales et que la cellule mutée a donné un groupe d'ovules qui contiennent chacun la mutation. Comme il y a plus d'un ovule affecté, un autre fils peut aussi hériter de la maladie ou une fille peut être un porteur génétique.

Les méthodes génétiques actuelles ne pouvant pas détecter une mosaïque de cellules germinales, on proposera un diagnostic prénatal lors d'une seconde grossesse à toute femme qui a déjà un garçon atteint de la dystrophie musculaire de Duchenne, et non seulement à celles qui sont des porteurs génétiques démontrés. (*Müller-Reible, Wurzburg*).

Evolution clinique de la dystrophie musculaire de Duchenne: Les premiers signes cliniques apparaissent vers l'âge de deux ou trois ans par des difficultés à marcher, en particulier à monter les escaliers. En l'absence de détection précoce, la maladie est généralement diagnostiquée vers 3 ou 5 ans. En raison de l'accroissement des contractures au niveau du pied, du genou et des hanches, les patients deviennent incapables de marcher vers l'âge de 10 à 12 ans. Augmentation des déformations de la colonne vertébrale, scoliose et restrictions de mouvement les rendent bientôt entièrement dépendants de soins intensifs. Les fonctions cardiaques et respiratoires étant touchées, ils décèdent à un âge adulte jeune d'une insuffisance cardiaque et circulatoire. Des opérations orthopédiques précoces destinées à éviter les contractures et les déformations de la colonne, ainsi que le recours à des aides respiratoires et à d'autres mesures, peuvent améliorer la qualité de vie et prolonger notablement l'espérance de vie.

Le diagnostic génique

Méthodes génétiques pour diagnostiquer la dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker chez un garçon, au cours d'une grossesse à risque et pour la détermination du statut de porteur chez une femme. Détection précoce dans la petite enfance.

Diagnostic de la dystrophie musculaire de Duchenne chez un garçon: Pour une analyse génique, on a besoin d'un échantillon de sang contenant des leucocytes. Ces globules blancs possèdent des noyaux qui contiennent l'ADN, le matériel héréditaire, ce qui n'est pas le cas des globules rouges. On isole les globules blancs et on en extrait l'ADN.

Comme près de 60% des patients ont des délétions d'un ou plusieurs exons dans leur gène de la dystrophine, on commence par rechercher ces délétions qui peuvent se trouver n'importe où sur le gène, mais qui sont plus nombreuses dans certaines régions que dans d'autres. Généralement, on commence par *amplifier* (multiplier) 19 exons sélectionnés parmi les 79 que compte le gène de la dystrophine. Normalement, on n'amplifie pas tous ces 19 exons en même temps, mais par *réactions multiplex*, par groupes de 4 à 6 exons.

On peut ainsi détecter 98% de toutes les délétions. Dans deux tiers de ces cas, on peut déjà en déduire si le cadre de lecture est oui ou non perturbé et prédire ainsi si le patient a une dystrophie de

Duchenne ou de Becker. Pour le troisième tiers, il est nécessaire d'amplifier davantage de gènes.

L'amplification est réalisée par la *réaction en chaîne de la polymérase*, ou PCR, qui requiert des amorces pour chaque exon. Les amorces sont des petites séquences d'ADN synthétisées qui se fixent au début et à la fin d'une séquence d'exon. Les petits fragments de gène ainsi obtenus sont séparés par électrophorèse car ils migrent à différentes distances dans une couche de gel et peuvent ensuite être rendus visibles sous forme de bandes de gel disposées comme les barreaux d'une échelle, mais à des distances variables. Chaque bande correspond à un des 79 exons. Une délétion se manifeste par l'absence d'une ou plusieurs de ces bandes.

Si aucune délétion n'est trouvée, il est probable qu'il y ait une mutation ponctuelle. Pour le confirmer sans équivoque, il faudrait déterminer les séquences de base de la plupart des exons. De telles déterminations séquentielles sont toutefois très pénibles et ne sont pas encore proposées en tests de routine. Dans ces cas, un diagnostic final ne peut être posé qu'après examen de tissu musculaire obtenu par biopsie. Ce n'est alors pas le gène de la dystrophine qui est analysé, mais la dystrophine elle-même par une réaction de *Western-Blot*.

Dans cette technique, les protéines, après avoir été isolées par électrophorèse, sont transférées sur un autre support par buvardage, pour y être rendues visibles à l'aide d'anticorps. Ou bien, des anticorps fluorescents sont fixés sur la dystrophine et peuvent ensuite être détectés au microscope sous la forme d'une ligne brillante entourant les cellules musculaires saines. Dans la dystrophie de Duchenne, on ne la voit pas, ou à l'état de traces, et dans la dystrophie de Becker, ces lignes sont souvent effilochées, interrompues et le plus souvent bien plus faibles que la normale.

Si une analyse génique donne un résultat sans équivoque, une biopsie musculaire n'est souvent pas nécessaire. On peut ainsi éviter cette intervention chirurgicale aux petits enfants. Toutefois, si une biopsie musculaire est nécessaire, on peut alors pratiquer une *biopsie à l'aiguille* sous anesthésie locale.

Diagnostic prénatal: Pour un diagnostic prénatal de la dystrophie de Duchenne, il faut généralement une raison précise, le plus souvent parce qu'il y a, ou qu'il y avait, déjà un malade dans la famille. Pour un diagnostic fait en début de grossesse, il faut obtenir du tissu de l'enfant à naître, soit par une *biopsie des villosités choriales* au cours de la 10^e à la 12^e semaine de grossesse ou par une *amniocentèse* dans la 13^e à la 16^e semaine.

Dans la biopsie des villosités choriales, on aspire un petit bout du futur placenta au travers d'une mince canule. Si on a la certitude d'avoir obtenu des cellules de l'enfant, on peut utiliser les tissus directement pour l'analyse. Les risques que cette intervention provoque une interruption de grossesse involontaire sont d'environ 3 à 5 %. L'avantage d'une amniocentèse est que le risque d'avortement est plus faible, moins de 1 %. Le désavantage est que les quelques cellules de l'enfant présentes dans le liquide amniotique doivent d'abord être multipliées en laboratoire et il faut parfois attendre jusqu'à 3 semaines avant de pouvoir commencer l'analyse, c'est-à-dire entre la 15^e et la 18^e semaine.

Si l'on a obtenu suffisamment de cellules de l'enfant, on commence par examiner les chromosomes, ce qui permet de déterminer le sexe de l'enfant. Si c'est une fille, on ne poursuit généralement pas l'examen parce que les conséquences d'être porteuse de la maladie de Duchenne devront être discutées avec la jeune fille quand elle sera en âge de les comprendre et de prendre ses décisions par elle-même.

Si l'enfant à naître est un garçon, on pratique alors une analyse génétique en utilisant les techniques décrites pour le diagnostic postnatal.

Diagnostic des porteuses génétiques: Si on connaît avec exactitude la mutation d'un garçon victime de la maladie de Duchenne, on peut rechercher la même mutation chez la mère et dans sa parenté féminine. Techniquement, ceci est plus difficile que chez les garçons parce qu'un seul des deux chromosomes X d'une femme peut porter la mutation. Si elle est porteuse génétique, l'intensité des bandes provenant de l'électrophorèse n'est diminuée que de moitié en présence d'une ou plusieurs délétions. Cependant, il n'est pas facile de contrôler l'amplification des exons. Et il est souvent difficile de détecter avec certitude les différences d'intensité des bandes.

C'est pourquoi, l'analyse fait souvent appel à des *marqueurs polymorphes*. Ce sont des séquences d'ADN situées dans les introns entre les exons, presque toujours disposées différemment sur un chromosome donné et qui ont aussi des longueurs différentes, ce qui permet de distinguer les deux chromosomes. Ces séquences de marquage n'ont rien à voir avec la maladie, elles sont caractéristiques de chaque individu et peuvent aussi être amplifiées par la technique de la PCR et être ensuite identifiées

sans équivoque après électrophorèse.

Si un garçon présente une délétion dans le gène de la dystrophine, il ne manque pas seulement un ou plusieurs exons, mais aussi les marqueurs dans les introns entre eux. Chez une femme, on peut vérifier si ces marqueurs manquent aussi sur l'un de ses chromosomes X. Si, comme chez son fils, ces marqueurs sont absents, la probabilité est alors grande qu'elle ait la même délétion que lui sur l'un de ses chromosomes X. Elle est donc une porteuse génétique. Si elle ne l'est pas, elle doit avoir d'autres marqueurs dans cette région.

On peut aussi utiliser les marqueurs d'ADN si le patient de la famille n'a pas de délétion. Mais alors, on ne sait pas à quoi ressemble la mutation. Mais, connaissant la disposition des marqueurs, il est possible de dire sur quel chromosome X de la mère se trouve le gène muté dont son fils malade a hérité. Dès lors, chaque femme de la famille porteuse du même chromosome X risque d'être une porteuse génétique.

Cette méthode indirecte est utilisée depuis bientôt 20 ans; on connaît toutefois maintenant beaucoup d'autres marqueurs. C'est pourquoi, on peut presque toujours distinguer les deux chromosomes X d'une femme l'un de l'autre et il est rare de nos jours qu'une famille soit *non-informative*.

Si, toutefois, aucune de ces méthodes ne réussit, on peut, il y a des cas où on peut marquer certaines régions de gènes sur le chromosome X au moyen de sondes géniques fluorescentes et vérifier ensuite au microscope la présence ou l'absence de points lumineux qui représentent des régions de gènes normaux ou délétés. Mais cette méthode, appelée *FISH* (fluorescence in situ hybridization) n'est utilisable que si certaines délétions spécifiques ont eu lieu dans la famille.

Analyse séquentielle de routine du gène de la dystrophine: Grâce à une nouvelle technique analytique appelée *SCAIP* (single condition amplification/internal primer), il va être possible, à l'avenir, d'analyser de façon routinière avec certitude les mutations ponctuelles en l'espace de trois jours, ainsi que les petites délétions et toutes les autres mutations. Dans cette méthode, tous les exons du gène de la dystrophine, toutes les zones limites intron-exon avec les signaux d'épissage et tous les promoteurs sont entièrement séquencés. Toutes ces régions de gènes, formant ensemble une chaîne de quelque 110.000 paires de bases, sont amplifiées avec leurs amorces particulières en une seule réaction de PCR, puis soumises à une micro-électrophorèse. Ceci permet de déterminer toutes les délétions d'exons et de promoteurs, y compris ceux qu'on ne voit pas avec les autres méthodes. La séquence de bases de chaque fragment de gène est ensuite déterminée automatiquement au moyen d'amorces de séquençage individuelles pour détecter les mutations ponctuelles.

Comme cette méthode détecte aussi toutes les mutations des porteurs de la maladie de Duchenne, elle permettra d'améliorer le conseil génétique. Des données sont rassemblées qui permettront de prédire l'évolution clinique d'une dystrophie musculaire de Duchenne ou de Becker sur la base d'une délétion, d'une duplication ou d'une mutation ponctuelle définie. Pour ceci, de nombreux patients devront être soumis à des examens cliniques et génétiques (*Flanigan*, Salt Lake City).

Détection précoce chez les bébés (sans technique génique): En Allemagne, on détecte la dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker, sur des bébés âgés de 4 semaines à 1 an n'ayant pas encore de symptômes cliniques, au moyen d'un *programme de criblage de la CK* volontaire au cours duquel on détermine l'enzyme CK (créatine kinase) dans une tache de sang séché. De 1974 à juillet 2003, plus de 500.000 bébés garçons ont été testés. Parmi eux, on a trouvé 178 garçons ayant des activités très élevées de CK. Chez ces derniers, on a diagnostiqué, ou considéré comme probables, 136 cas de dystrophie musculaire de Duchenne (1:3,700) et 28 cas de dystrophie musculaire de Becker (1:17,800).

La détection précoce permet aux parents de *prendre à temps les décisions qu'ils considèrent comme correctes*, de sorte qu'aucun enfant ayant la même maladie ne naisse dans la même famille ou dans les familles du côté maternel. En outre, on évite le *parcours du combattant* qui exige souvent plusieurs ans avant qu'on trouve un spécialiste des maladies musculaires. Dans le futur, de tels programmes seront nécessaires parce que les progrès de la recherche thérapeutique conduiront à des études impliquant des patients très jeunes n'ayant aucun symptôme clinique et dont les muscles sont encore largement intacts (*Scheuerbrandt*, Breitnau/Fribourg).

Possibilités thérapeutiques

Stratégies de recherche d'un traitement causal.

Il n'existe encore aucun traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne.

Pour guérir la dystrophie musculaire de Duchenne, conséquence de la mutation qui a endommagé le gène de la dystrophine, la dégénérescence musculaire doit être stoppée ou tout au moins atténuée. La recherche tente de le faire au moyen de la *thérapie génique* ou de la *thérapie médicamenteuse*. Le terme "thérapie génique" signifie que l'on introduit dans chaque cellule musculaire toutes les sections actives, les exons, du gène intact de la dystrophine, son *ADNc*, ou certaines de ses parties, ou que le dommage spécifique du gène est réparé par des techniques génétiques. La thérapie médicamenteuse consiste à administrer une substance chimique ordinaire, un médicament normal, qui n'a rien à voir avec un gène, pour bloquer ou ralentir la dégénérescence musculaire. Dans ces deux approches, des progrès ont été réalisés au cours de ces quelques dernières années.

Il n'y a pas encore de thérapie: En dépit de ces progrès, on n'a pas encore développé de thérapie génique ou médicamenteuse qui permette de traiter les garçons atteints de la maladie de Duchenne. On a trouvé un seul type de médicaments, trois stéroïdes étroitement apparentés, la *prednisone*, la *prednisolone*, et le *deflazacort*, qui peuvent ralentir la dégénérescence des muscles pendant une période limitée.

En raison de la gravité de la maladie, les familles des patients, leurs médecins et le public en général sont désespérément à l'affût du moindre résultat positif de la recherche et les médias, principalement les journaux et la télévision, même les plus responsables, ont tendance à exagérer de petits progrès en les qualifiant d'avancées importantes. Mais les scientifiques eux-mêmes manifestent souvent un optimisme exagéré et peuvent déclarer que des résultats obtenus dans des expériences chez l'animal sont des victoires thérapeutiques, suscitant de faux espoirs. *Pas un seul garçon atteint de la dystrophie de Duchenne n'a été guéri.*

Transfert d'un nouveau gène de la dystrophine

On peut transférer dans les cellules musculaires les exons du gène de la dystrophine, entier ou raccourci, à l'aide de virus, plasmides ou myoblastes. Il faut éviter les réactions immunitaires.

Il apparaît raisonnable de penser que le transfert, le transport, de quantités suffisantes du gène intact de la dystrophine dans les noyaux de cellules de muscle dystrophique pourrait guérir de la maladie. Il faut pour cela que l'information génétique des nouveaux gènes soit utilisée par les ribosomes effectuant la synthèse des protéines pour produire des quantités assez grandes de dystrophine fonctionnelle, qui doit ensuite migrer vers son emplacement normal sous la membrane cellulaire, pour être incorporée normalement dans le complexe serré dystrophine-glycoprotéine des costamères.

La souris dystrophique: La majorité des expériences de transfert de gènes se font avec un type d'animal de laboratoire: la *souris mdx* dystrophique, qui porte une mutation ponctuelle sur le nucléotide 3185 dans l'exon 23 de son gène de la dystrophine. Cette mutation a changé un codon CAA, qui signifie l'acide aminé glutamine, en un codon TAA, qui est un codon stop, de sorte que la synthèse de la dystrophine s'arrête prématurément et que la souris n'a pas de dystrophine fonctionnelle dans ses muscles. Toutefois, ces souris ne perdent pas leurs muscles car elle ne développent pas de *fibrose*, une prolifération du tissu conjonctif, comme les garçons atteints de la maladie de Duchenne, si bien que les processus dégénératifs causés par la maladie ne l'emportent pas sur la régénération.

Bien que le transfert de gènes puisse être étudié chez ces souris, il faut se souvenir que les résultats obtenus avec ces souris ne peuvent pas être considérés comme applicables aux enfants sans que l'on fasse des études cliniques sur des patients atteints de la maladie de Duchenne. *Un enfant n'est pas une grande souris!*

Le chien dystrophique: Certaines expériences ont été faites chez le chien dystrophique, le chien GRMD (*golden retriever muscular dystrophy*), qui, contrairement à la souris, présente une dystrophie musculaire semblable à la dystrophie de Duchenne. Ces chiens sont vraiment handicapés et donc difficiles à élever et à conserver. Leur gène de la dystrophine porte une mutation ponctuelle dans le site récepteur d'épissage de l'intron 6, ce qui entraîne une délétion de l'exon 7 dans l'ARNm, un déplacement du cadre de lecture et un codon stop prématuré.

Transfert de gènes avec des adénovirus: Pour que l'on puisse transférer un gène, il faut un transporteur, un *vecteur de gène*. Une façon de transférer du matériel génétique dans des cellules

vivantes consiste à l'emballer dans des virus qui sont composés d'un ruban de leurs propres gènes enveloppés dans une enveloppe protéique. Ils s'attachent à la surface d'une cellule vivante, introduisent leurs gènes dans la cellule et utilisent ensuite le propre appareil de synthèse de la cellule pour se reproduire.

Dans la recherche sur la maladie de Duchenne, on utilise essentiellement deux types de virus comme vecteurs de gènes, l'*adénovirus* et le *virus adéno-associé*, dix fois plus petit. Ces virus ne peuvent plus se multiplier à l'intérieur des cellules cibles car les scientifiques ont éliminé presque tous leurs gènes. Le virus le plus avantageux semble être l'adénovirus *évidé*, pratiquement vide, qui ne contient aucun de ses propres gènes et a donc de la place pour près de 36.000 lettres génétiques étrangères, suffisantes pour coder tout l'ADNc contenant l'information entière de la protéine dystrophine. Avec ces virus évidés, de la dystrophine nouvelle a été synthétisée dans près de 30% des fibres musculaires d'une souris dystrophique, phénomène qui a été suivi d'une amélioration de la fonction musculaire tant chez la souris jeune que chez la souris plus âgée. (*Lochmüller*, Munich; *Chamberlain*, Seattle).

Deux gènes dans le même virus: Dans des expériences récentes, deux ADNc de dystrophine de souris ont été introduits dans chacun des virus évidés, c'est-à-dire deux fois l'ensemble des 79 exons sans les introns, ainsi que deux séquences géniques supplémentaires, le très puissant promoteur du cytomégalovirus et le promoteur de la bêta-actine. Ces vecteurs ont été injectés dans le muscle tibial antérieur de souris mdx nouveau-nées et de jeunes souris âgées de 4-6 semaines. Au bout de 30 jours, 42 % des cellules du muscle traité des souris nouveau-nées avaient de la nouvelle dystrophine qu'on pouvait encore détecter 6 mois plus tard. Chez les jeunes souris, 24 % des cellules musculaires avaient de la nouvelle dystrophine au bout de 30 jours, dont la quantité avait cependant diminué de moitié au bout de 6 mois. Seules les jeunes souris ont eu de légers problèmes immunitaires. A l'heure actuelle, ces nouveaux vecteurs sont les vecteurs les plus efficaces pour le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne par thérapie génique (*Karpati*, Montréal).

Transfert de gènes avec les virus adéno-associés: Les petits virus *adéno-associés* peuvent uniquement transporter du matériel génétique qui ne dépasse pas 5.000 nucléotides environ, ce qui correspond à un tiers de l'ADNc complet de la dystrophine. Leur avantage réside dans le fait qu'ils transfèrent le gène plus efficacement que l'adénovirus normal. Le désavantage est le fait que l'ADNc à transférer doit être considérablement raccourci de façon à pouvoir se loger dans ce petit vecteur. Les patients souffrant de la dystrophie musculaire de Becker, qui progresse beaucoup plus lentement que la dystrophie de Duchenne, ont dans leurs muscles une dystrophine raccourcie de la sorte. Par conséquent, une éventuelle thérapie génique transférant l'un de ces *mini-gènes de Becker* ne guérirait pas complètement la dystrophie musculaire de Duchenne, mais la transformerait en la forme de Becker, bénigne.

Afin de déterminer lesquelles des quatre régions de la protéine de dystrophine normale sont importantes - les deux extrémités, la région riche en cystéine ou le bâtonnet central, des expériences approfondies ont été effectuées, dans lesquelles des souris dystrophiques ont été génétiquement modifiées de façon à exprimer dans leurs muscles l'une des neuf différentes dystrophines raccourcies.

L'on savait déjà qu'une partie de la région centrale en forme de bâtonnet pouvait être éliminée sans perte de fonction. L'analyse détaillée de la structure tridimensionnelle a révélé maintenant quelles parties spécifiques de la structure en forme de bâtonnet peuvent être détruites sans perte significative de la fonction de protection du muscle. L'une des dystrophines raccourcies, qui avait à peu près la moitié de la longueur de la protéine normale, avait pratiquement les mêmes propriétés que la protéine intacte. Le transfert de ce gène de dystrophine raccourcie et de certains autres, au moyen de virus adéno-associés dans les muscles de souris mdx a prévenu, et en partie éliminé, les symptômes de la dystrophie. Ces résultats ont montré que des modifications spécifiques de la dystrophine pouvaient générer de nouvelles protéines qui sont significativement plus petites, mais plus fonctionnelles, que les dystrophines raccourcies naturellement des patients atteints de la dystrophie musculaire de Becker (*Chamberlain*, Seattle).

Si 30% environ de la quantité normale de dystrophine intacte réapparaissent, des mesures effectuées sur le diaphragme de souris indiquent que la fonction musculaire s'améliore aussi. De même, le transfert du mini-gène entraîne une amélioration de la fonction musculaire. En outre, ces expériences ont montré que le transfert de gènes donne de meilleurs résultats chez l'animal jeune car il y a moins de problèmes de rejet immunitaire et, après une injection unique, la dystrophine néo-synthétisée reste plus longtemps

dans les muscles que chez l'animal adulte. Après une application unique à des souris nouveau-nées, la dystrophine néo-synthétisée peut encore être détectée une année plus tard.

Dans la perspective d'une application future à l'homme, cela signifie que les patients devraient être traités dès que possible après la naissance, lorsque leurs muscles sont encore largement intacts (Clemens, Pittsburgh).

Transfert de gène par la voie de la circulation sanguine: Dans les expériences décrites jusqu'ici, des solutions de virus contenant le gène de la dystrophine étaient injectées directement dans les muscles de l'animal. Pour que tous les muscles, même ceux du cœur et des poumons, puissent être atteints, des expériences sont en cours visant à développer un *traitement systémique*, c'est-à-dire un traitement offrant la possibilité d'injecter les virus dans la circulation sanguine. Afin de s'assurer que la nouvelle dystrophine n'est synthétisée que dans les cellules musculaires, l'on ajoute une autre séquence génétique au gène de la dystrophine dans le virus, le *promoteur de la CK*, long de 1.354 nucléotides qui active normalement le gène d'une protéine musculaire, la créatine kinase. Ce promoteur garantirait que le nouveau gène de la dystrophine est activé uniquement dans les cellules musculaires et non ailleurs.

Pour étudier si de telles stratégies donneraient des résultats chez l'animal vivant, on a créé des souris mdx *transgéniques* qui possédaient un gène supplémentaire inséré dans leurs chromosomes. Il s'agissait d'un gène de la dystrophie de Becker souvent utilisé qui, avec ses 6.300 nucléotides, a la moitié de la longueur d'un gène normal et qui était précédé par un promoteur de la CK contenant 1.354 nucléotides. De la dystrophine raccourcie a alors été présente durant toute la vie des souris, soit jusqu'à 24 mois, ceci en quantités suffisantes pour améliorer tous les symptômes cliniques mesurables.

La nouvelle protéine n'est apparue que dans les muscles des souris transgéniques, nettement plus dans les muscles rapides que dans les muscles lents. Les muscles rapides, qui travaillent immédiatement mais pas de façon continue, obtiennent leur énergie de la glycolyse, c'est-à-dire de la dégradation rapide du glucose qui n'utilise pas d'oxygène. L'énergie des muscles lents qui travaillent continuellement provient des enzymes de la chaîne respiratoire, "l'oxydation" lente des substances organiques par l'oxygène. Comme les muscles rapides sont les premiers détruits par la dystrophie musculaire, la présence prédominante de nouvelle dystrophine dans ces muscles rapides permet justement d'améliorer cette première conséquence de la maladie. Des tests ont montré que seuls 20 à 30% de la quantité normale de dystrophine avaient une activité thérapeutique notable.

Pour ces expériences avec des souris transgéniques, on a introduit le gène de la dystrophine de Becker avec le promoteur de la CK dans les cellules germinales par insémination artificielle et manipulation génétique, de sorte qu'on le retrouve dans le patrimoine génétique transmis à la descendance de ces souris. Cette technique ne peut évidemment être appliquée à l'homme. Pour soigner les enfants malades, il faudrait pouvoir transporter le gène avec son promoteur par une technique de transplantation génique au moyen d'un vecteur juste après la naissance et dans tous les muscles, si possible (Lochmüller, Munich).

Amplification du transfert de gène désiré: Les virus se lient à des structures spécifiques sur la membrane cellulaire, les *récepteurs* de coxsackie et des adénovirus, à partir desquels ils pénètrent ensuite, à travers la membrane, à l'intérieur de la cellule musculaire. Toutefois, ces récepteurs sont plus nombreux sur les cellules en phase de développement ou de régénération. A l'inverse, ils sont réprimés, moins nombreux, dans les muscles arrivés à maturité qui ne se divisent plus. Ainsi, le transfert de gènes au moyen de vecteurs adénoviraux est plus efficace dans les cellules musculaires qui se divisent.

Pour surmonter ce handicap, on a produit des souris transgéniques qui expriment ces récepteurs en grand nombre à la surface des fibres musculaires matures. Le résultat a été un transfert 10 fois plus efficace du gène de la dystrophine (Holland, Montreal; Lochmüller, Munich).

Comme on ne pouvait multiplier les récepteurs à virus sur les cellules musculaires d'un patient que par d'autres techniques géniques, on a, au vu des risques, produit des protéines "helper". Dans ce cas, il s'agissait d'anticorps monoclonaux faits d'une seule sorte de molécules pouvant se lier très spécifiquement, par une de leurs extrémités, à d'autres récepteurs plus nombreux. Par leur autre extrémité, ces protéines du système immunitaire pouvaient se lier aux protéines enveloppes modifiées des adénovirus. Pour réaliser cette liaison, il a fallu introduire dans les adénovirus, par manipulation génétique, une information supplémentaire pour une chaîne de 33 acides aminés provenant d'une bactérie.

Ces adénovirus ont alors pu se fixer, par l'intermédiaire du pont d'anticorps, sur les récepteurs de

l'intégrine et des nerfs (NCAM) qui étaient bien plus nombreux que les adénorécepteurs. Cette méthode a permis le passage de 77 fois plus d'adénovirus dans la cellule musculaire au travers de la membrane que précédemment. Avec cette nouvelle technique, qu'on peut utiliser aussi contre d'autres maladies, on n'a transporté que le gène qui produit la bêta-galactosidase, une protéine facilement détectable. Des expériences de transfert du gène de la dystrophine sont en préparation (*Kochanek*, Cologne).

Transfert de gènes nus: Dans cette technique, le matériel génétique, l'ADN, à transférer n'est pas incorporé dans un virus, mais dans des plasmides, qui sont de petites structures d'ADN circulaire dépourvues de protéines, que l'on trouve parfois en grandes quantités dans les bactéries, où elles confèrent principalement la résistance aux antibiotiques. L'avantage de ce type de transfert de gènes réside dans le fait que les plasmides ne contiennent pas de protéines mais uniquement du matériel génétique, de l'*ADN nu*, de sorte qu'aucune réaction immunitaire ne se développe contre le matériel du vecteur.

Des expériences ont été faites avec des plasmides contenant des gènes marqueurs ou rapporteurs, des gènes dont les protéines peuvent être détectées dans le tissu musculaire par coloration ou par production de lumière, de sorte qu'il est facile de contrôler si une expérience de transfert a réussi. Lorsque des volumes relativement grands d'une solution de ces plasmides ont été injectés *sous pression* dans les artérioles des membres de rats et de singes rhésus, les gènes rapporteurs beta-galactosidase et luciférase ont été transférés dans près de 20% des fibres musculaires après une seule injection et dans près de 40% des fibres musculaires après des injections répétées. La pression a été produite en bloquant l'efflux de sang veineux d'un membre pendant une brève période. Des expériences de transfert du gène de la dystrophine chez la souris mdx, le singe et le chien GRMD sont actuellement en cours (*Wolff*, Madison; *Braun*, Strasbourg). En France, des études cliniques avec des garçons souffrant de la maladie de Duchenne ont débuté. Elles sont décrites sous "Etudes cliniques".

Expériences effectuées pour surmonter les problèmes immunologiques: L'ADN sous forme de plasmide ne contenant pas de protéines, le transfert de gènes au moyen de ces ADN nus permet aussi d'examiner les éventuels problèmes de réponses immunitaires à la nouvelle dystrophine créée sans qu'il y ait d'interférences de la part d'autres protéines, qui sont introduites lorsque l'on utilise d'autres méthodes de transfert de gènes au moyen des vecteurs viraux et cellulaires.

Des études sur la souris mdx ont montré que des réponses immunitaires étaient générées contre la dystrophine humaine mais non contre la dystrophine de souris, malgré l'*absence* de dystrophine normale dans les muscles de la souris. L'absence de réponse immunitaire contre la dystrophine de souris peut avoir été due à la présence d'autres formes de dystrophine. Ces résultats suggèrent que les réponses immunitaires au transfert de gène de la dystrophine ne représentent peut-être pas un problème particulier chez les patients atteints de la dystrophie de Duchenne, en particulier chez ceux qui portent des mutations ponctuelles qui n'interfèrent pas avec la synthèse des autres formes de dystrophine. Le travail expérimental actuel vise à déterminer laquelle des autres dystrophines doit être présente pour permettre une tolérance immunitaire à l'apparition d'une nouvelle dystrophine de type musculaire après transfert de gène (*Wells*, Londres).

Essais avec des cellules souches

Parmi les cellules satellites et les myoblastes des muscles, les cellules de la peau et les vaisseaux sanguins, il y a les cellules souches qui peuvent former de nouveaux muscles ou les régénérer.

Des cellules souches sont présentes dans de nombreux tissus du corps, notamment dans les muscles squelettiques et la moelle osseuse. Ce sont des cellules non spécialisées qui peuvent se différencier pour donner un grand nombre de cellules spécialisées, comme par exemple des cellules souches de moelle osseuse qui peuvent se transformer en divers types de cellules sanguines ou les cellules souches musculaires qui peuvent donner de nouvelles cellules musculaires.

Ces cellules *pluripotentes* sont des cellules souches somatiques ou adultes, par opposition aux cellules souches embryonnaires, qui sont *totipotentes* et peuvent donc se différencier en *tous* les types de cellules du corps et de cellules germinales. La recherche sur les cellules souches pour trouver un traitement à la dystrophie de Duchenne n'utilise que des cellules souches adultes d'animaux de laboratoire, ce qui permettra d'éviter les problèmes liés à l'utilisation de cellules souches embryonnaires

humaines.

Cellules souches de muscles squelettiques: A la surface des cellules musculaires, on trouve des cellules satellites, appelées aussi "cellules myogéniques" ou "myoblastes", qui, après avoir subi une activation en plusieurs stades intermédiaires, sont capables de former de nouveaux muscles ou de réparer des muscles endommagés. Pour déterminer si ces cellules dites "de sûreté" sont des cellules souches en partie ou en totalité, des cellules satellites des muscles squelettiques de souris nouveau-nées ont été isolées. On a trouvé qu'elles étaient de trois types, dont surtout les cellules myogéniques appelées EP et LP qui sont déjà très spécialisées. Celles du troisième type sont les *muscle derived stem cells* (cellules souches du muscle) ou MDSC. Elles sont très rares, une seule cellule MDS sur 100.000 cellules satellites. Mais ces cellules rares sont *pluripotentes*, c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier en cellules musculaires aussi bien qu'en cellules nerveuses ou en cellules pariétales pour des nouveaux muscles. Enfin, elles peuvent être mises en culture pendant longtemps.

Ces cellules MDS ont été multipliées en laboratoire et 400.000 d'entre elles injectées en un bolus de 25 microlitres (1/40 de centimètre cube) dans un muscle de souris mdx vivantes. Afin de déterminer en quoi les cellules EP plus spécialisées diffèrent des cellules myogéniques normales, les premières ont aussi été injectées à des souris mdx dans les mêmes conditions.

Chez les souris traitées avec les cellules EP, 130 muscles contenaient de la nouvelle dystrophine au site d'injection au bout de 30 jours, mais après 90 jours, celle-ci avait en grande partie disparu. Chez ces souris, on a constaté un rejet immunitaire par les lymphocytes, probablement responsable de la disparition progressive de la nouvelle dystrophine.

Contrairement aux résultats ci-dessus, 1.500 cellules musculaires traitées avec des cellules MDS contenaient de la nouvelle dystrophine au site d'injection, en quantité 10 fois supérieure à celle qui a résulté de l'injection de cellules EP. Même au bout de 90 jours, la nouvelle dystrophine était encore présente dans toutes ces cellules pratiquement. Dans ce cas, il n'y a eu *aucun* rejet immunitaire, bien que les souris réceptrices n'aient reçu aucun traitement immunosuppresseur.

Comme les cellules souches utilisées dans ces expériences ont été prélevées sur des souris *nouveau-nées* normales, cette technique ne pourra probablement pas être appliquée telle quelle aux enfants atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne. Ces résultats pourraient avoir toutefois une influence sur les essais sur les myoblastes repris récemment (*Huard, Pittsburgh; Wernig, Bonn*).

Cellules souches de moelle osseuse, de muscles et de peau: La fin de la dernière décennie a vu les premiers essais conduits avec des cellules souches de moelle osseuse et des cellules satellites de muscle. Dans toutes ces expériences, les cellules souches ont été extraites de souris mâles normales avec des gènes normaux de la dystrophine et injectées dans la veine caudale de souris mdx femelles. Celles-ci étaient homozygotes, c'est-à-dire que les gènes de dystrophine de leurs *deux* chromosomes X portaient une mutation qui les empêchait de produire leur propre dystrophine. Le devenir des cellules injectées a pu être suivi par la détection du chromosome mâle Y. Les souris femelles durent recevoir des doses létales de rayons X pour prévenir toute réaction immunitaire. Le transfert de cellules souches a régénéré la moelle épinière des souris.

Pour commencer, on a injecté 10 à 50 millions de cellules provenant de moelle osseuse non traitée. Trois mois plus tard, on a pu détecter de la dystrophine dans près de 10 % des cellules musculaires des souris. Certaines cellules contenant cette dystrophine contenaient aussi des chromosomes Y, preuve que les cellules de moelle osseuse provenant des souris mâles normales étaient venues au travers de la circulation sanguine et avaient fusionné avec les cellules musculaires des souris mdx. Ces cellules avaient amené avec elles l'information pour la dystrophine normale qui a ensuite servi à la production de dystrophine fonctionnelle. Il était important de prouver que la nouvelle dystrophine n'était pas le résultat d'une réversion, c'est-à-dire de l'omission spontanée d'un exon, ce qui arrive parfois chez les souris mdx ainsi que chez les garçons victimes de la dystrophie musculaire de Duchenne.

Pour déterminer quelle partie des cellules de moelle osseuse a les propriétés des cellules souches, on a pu isoler une petite population de cellules excluant le colorant Hoechst 33343, ou population SP, du mélange cellulaire originel en utilisant la méthode dite FACS, pour *fluorescence-activated cell sorting*. Comme ces cellules SP avaient des propriétés de cellules souches, elles ont été utilisées à d'autres expériences. Trois mois après injection de seulement 2.000 à 5.000 de ces cellules SP de moelle osseuse, près de 4 % des cellules musculaires des souris mdx avaient de la dystrophine fonctionnelle.

De la même manière, on a isolé des cellules souches musculaires SP dans des cellules musculaires satellites, et 7.000 à 20.000 d'entre elles ont été injectées dans la circulation sanguine de souris mdx femelles. Au bout d'un mois, 5 à 9 % de leurs cellules musculaires contenaient de la dystrophine normale et certaines avaient aussi des chromosomes Y.

Ces expériences ont été renouvelées en 2002/2003 et étendues à des cellules souches prélevées de la peau. L'avantage de les prendre de la peau est que les tissus cutanés sont plus facilement accessibles que les tissus musculaires et que les animaux récepteurs n'ont plus besoin d'être irradiés.

Une petite population de cellules excluant le colorant Hoechst 33343 a été obtenue au moyen de la technique FACS à partir de cellules de peau également, qui avaient les mêmes propriétés de surface, les mêmes marqueurs, que les cellules souches musculaires SP. Les pourcentages de cellules SP étaient maintenant de 0,1 % pour celles de moelle osseuse, de 0,7 % pour celles de muscles, et 1,2 % pour celles de peau. Trois mois après l'injection de 6.000 à 50.000 cellules SP de peau, 2,3 % des cellules musculaires de souris femelles contenaient de la nouvelle dystrophine et quelques unes contenaient aussi des chromosomes Y.

Cette expérience a démontré que des cellules souches pouvaient être isolées de la peau et qu'elles pouvaient, après passage dans la circulation sanguine, former de nouvelles cellules musculaires ayant de la dystrophine normale. Cette technique n'est pas encore suffisamment efficace pour constituer une thérapie utile, mais après optimisation, il devrait être possible de baser sur elle une thérapie de la dystrophie musculaire de Duchenne (*Kunkel, Boston*).

Activation de cellules souches musculaires: les cellules souches avec des structures de surface spécifiques qui se trouvent dans des muscles *intacts*, ne se sont pas développées en nouvelles cellules musculaires, elles n'étaient *pas myogéniques*. Mais si les muscles étaient endommagés et si les cellules musculaires se régénéraient d'elles-mêmes, alors le nombre de cellules souches pouvait augmenter jusqu'à 10 fois. Ces cellules étaient alors *myogéniques*, elles se transformaient en myoblastes et en nouvelles cellules musculaires, comme l'ont montré des expériences sur des cultures cellulaires et des souris. Cette activation était déclenchée par les protéines Wnt, une famille de protéines transmetteurs de signaux qui semblent produites par les cellules des muscles lésés et qui jouent aussi un rôle au cours du développement embryonnaire (*Rudnicki, Ottawa*).

Plusieurs protéines Wnt ont maintenant été isolées et caractérisées. Elles ont une longueur d'environ 400 acides aminés et contiennent de l'acide palmitique, un acide gras qui semble jouer un rôle important dans la transmission des signaux moléculaires (*Nusse, Stanford*).

Mésoangioblastes, les cellules souches des vaisseaux sanguins: Un demi million de cellules souches récemment détectées dans les vaisseaux sanguins de fœtus de souris normales ont été injectées en une fois dans l'artère de pattes arrières de souris. Ces souris étaient dépourvues d'une protéine du complexe de la dystrophine, l'alpha sarcoglycane responsable chez l'homme d'une des nombreuses dystrophies des ceintures. Une fois injectées, les cellules ont migré dans les capillaires sanguins, traversé leurs parois cellulaires et de là, pénétré dans tous les muscles de la patte ayant reçu l'injection, surtout dans les fibres en régénération.

Dans les trois mois au moins qui ont suivi l'injection, du nouveau sarcoglycane a été présent en quantités presque normales à nouveau. Il en a été de même pour les nombreuses autres protéines du complexe de la dystrophine également manquantes précédemment. Il n'y a pas eu de réaction de rejet non plus. Après trois injections consécutives à 40 jours d'intervalle, non seulement le défaut du gène était presque entièrement corrigé, mais la force musculaire de la patte traitée était à nouveau pratiquement normalisée. Ici aussi, on n'a eu aucun problème de rejet.

Pour vérifier si cette technique pouvait être éventuellement employée dans la thérapie génique, on a isolé les mésoangioblastes de souris "malades" et le gène de l'alpha sarcoglycane manquant a ensuite été transféré au moyen de rétrovirus dans ces cellules souches déficientes. L'application systémique de ces cellules traitées *ex vivo* a donné les mêmes résultats positifs que ceux obtenus avec des cellules normales. Cependant, les rétrovirus, qui s'insèrent dans les chromosomes avec le gène thérapeutique transporté, ne devraient pas être utilisés sur l'homme en raison du risque qu'ils ne provoquent un cancer. Pour ces expériences, les cellules souches dérivées des vaisseaux sanguins ont été extraites de souris non encore nées. Mais, s'il était possible de les extraire aussi d'enfants atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne, ces résultats positifs inattendus signifieraient que nombre de problèmes liés aux expériences actuelles de transfert de gènes pourraient être évités, comme par exemple la faible

efficacité, le rejet immunitaire et la nécessité de faire de nombreuses injections dans tous les muscles qui peuvent être atteints.

Dans ces cellules extraites de patients, il faudrait pouvoir transférer des gènes de la dystrophine intacts par une technique *ex vivo* en utilisant les vecteurs connus, puis les multiplier en laboratoire et finalement, les réinjecter dans les artères les plus importantes de l'enfant. Il est possible qu'il faille répéter le traitement au bout de plusieurs mois, c'est pourquoi il est important que ces cellules ne soient pas rejetées par le système immunitaire. Un des avantages les plus importants avec cette technique serait alors que tous les muscles pourraient être atteints, y compris les muscles du cœur et de la respiration. Il s'agirait alors d'un traitement systémique requérant relativement peu d'injections comparé aux autres approches de thérapie génique (Cossu, Milan).

Une expérience de la nature sur les cellules souches: A l'âge d'un an, un garçon atteint de la dystrophie de Duchenne a reçu des cellules souches de moelle osseuse de son père parce qu'il souffrait d'une autre maladie. Comme il était encore capable de marcher à l'âge de 14 ans malgré un déplacement du cadre de lecture causé par une délétion de l'exon 45, on s'est demandé si c'étaient les cellules souches provenant de la moelle épinière qui avaient fourni l'information nécessaire à la production de la nouvelle dystrophine. Des examens effectués sur du nouveau matériel de biopsie ont toutefois montré que les symptômes plus légers de la maladie n'étaient dus que pour une toute petite partie à la transplantation, mais surtout par une délétion supplémentaire spontanée de l'exon 44 qui fait que, dans l'ARNm, l'exon 46 suit directement l'exon 43. Ce saut d'exon normalise le cadre de lecture. De la dystrophine peut être produite à nouveau, mais elle est plus courte et provoque donc les symptômes d'une dystrophie de Becker (cf. paragraphe omission d'un exon). Ainsi, semble-t-il, au bout de 13 ans, une transplantation de moelle osseuse peut contribuer dans une certaine mesure au traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne, mais pas suffisamment pour modifier de façon significative le cours de la maladie (Kunkel, Boston).

Thérapie cellulaire avec myoblastes: Les muscles ont leurs propres cellules souches, les cellules satellites ou myoblastes, qui, durant le développement ou la réparation des muscles, fusionnent les unes avec les autres pour donner des myotubes, puis de longues fibres musculaires. Parce que l'expression "transfert de myoblastes" a été utilisée à tort et à travers, on préfère aujourd'hui parler de *cellules myogéniques* plutôt que de myoblastes.

Dans les années 1990 et 1991, toute une série d'essais cliniques ont été effectués chez des enfants atteints de la maladie de Duchenne avec une technique qui avait montré des résultats positifs chez la souris mdx: le *transfert des myoblastes*. Prélevées sur un donneur sain, le plus souvent le père de l'enfant, et contenant donc le gène normal de la dystrophine, ces cellules ont été injectées en de nombreux endroits, à 0,5 cm de distance, directement dans des muscles dystrophiques, avec l'espoir que des cellules musculaires avec dystrophine normale se forment. Ces expériences n'ont pas réussi chez les garçons atteints de la maladie de Duchenne parce que les myoblastes n'ont pas migré suffisamment loin des points d'injection, qu'il y a eu des problèmes immunologiques et que, surtout, presque tous les myoblastes injectés sont morts peu après (Karpati, Montréal et d'autres).

Nouveaux essais de transplantation de myoblastes: Les expériences se poursuivent pour tenter de déterminer pourquoi bien moins de 1% des myoblastes transplantés dans des fibres musculaires dystrophiques survivent. On tente actuellement de caractériser ces quelques cellules actives et de trouver la manière de les distinguer des cellules inactives. C'est pourquoi, on est à la recherche de signaux moléculaires, c'est-à-dire de substances particulières dans les cellules musculaires capables d'activer les myoblastes (Partridge, Londres).

Dans les premières expériences, seuls deux médicaments connus, la cyclosporine A et le cyclophosphamide, avaient été utilisés pour supprimer les réactions immunitaires chez les patients dystrophiques. A l'heure actuelle, d'autres substances ont été étudiées dans des essais sur des singes. On a ainsi montré que l'inhibiteur d'immunité FK506, seul ou associé à l'inhibiteur MMF, prévenait beaucoup mieux les rejets pendant plusieurs mois. Une plus grande densité de sites d'injection distants de 1 mm seulement et un plus grand nombre de cellules transplantées ont contribué à ce que, chez les singes, jusqu'à 67 % des cellules musculaires aient absorbé les myoblastes, elles sont alors devenues des cellules musculaires *hybrides* (Tremblay, Québec City).

Une étude clinique utilisant la technique modifiée a débuté au Canada (cf. section "Essais cliniques").

Dans d'autres laboratoires, aussi, le travail est en cours pour améliorer cette technique de thérapie génique. On a ainsi découvert que m144, une protéine du système immunitaire, prévenait la mort immédiate des myoblastes après leur transplantation dans les muscles de souris (*Hodgetts, Crawley, Australie*).

Essais de thérapie génique *ex vivo*: En isolant des myoblastes d'un patient atteint de la dystrophie de Duchenne, en y introduisant le gène correct de la dystrophine et en réinjectant ensuite ces myoblastes, on éviterait la plupart des problèmes immunologiques. Dans des expériences préliminaires, l'*électroporation* a été utilisée pour transporter des plasmides contenant le gène d'une protéine marqueur fluorescente à travers la membrane cellulaire de myoblastes humains en culture. Cette technique perméabilise temporairement les membranes par le biais d'une décharge électrique unique, par exemple 400 V sur une distance de 4 mm. Dans les conditions optimales, jusqu'à 70% des myoblastes ont été transférés avec le gène et ont exprimé la protéine marqueur. La capacité des myoblastes à fusionner en myotubes, un autre stade du développement musculaire, n'a pas été altérée. (*Bernheim, Genève*)

Modification de l'information génétique (réparation du gène)

On répare les mutations du gène de la dystrophine sur le chromosome X avec des oligoribonucléotides.

**On omet des exons entiers pour permettre la restauration du cadre de lecture.
Les codons stop prématurés peuvent éventuellement être omis.**

Des expériences ont été entreprises, non pas pour introduire une séquence fonctionnelle du gène de la dystrophine dans des cellules musculaires, mais pour modifier l'information génétique défectueuse, en *réparant* donc la mutation. Une telle technique présenterait quatre avantages importants: (1) on éviterait les risques liés à un transfert de gènes par des virus, (2) ce n'est pas seulement la dystrophine du muscle squelettique, mais aussi toutes les autres formes de dystrophine qui seraient réparées, (3) la régulation tissulaire spécifique de la production de dystrophine serait maintenue et (4) la fabrication de l'agent thérapeutique, des *oligonucléotides*, serait probablement plus facile et moins coûteuse que la production de vecteurs viraux contenant le matériel génétique à transporter.

Les oligonucléotides sont de courtes séquences spécifiques d'ADN ou d'ARN, qui sont composées de quelques bases reliées entre elles par des ponts ribose-phosphate ou désoxy-ribose-phosphate du squelette de l'acide nucléique. Ils peuvent être produits de façon automatique.

Trois types de stratégies de réparation sont appliquées: (1) la réparation de la mutation au niveau du gène lui-même, (2) la modification de l'information génétique pendant la transcription en ARN par *omission d'exon*, et (3) l'ignorance d'un codon stop prématuré.

Réparation du gène chez le chien GRMD: Des essais de réparation de mutations ponctuelles au niveau du gène sont effectués en utilisant de courts oligonucléotides chimériques qui contiennent à la fois de l'ARN sur un brin et de l'ADN sur l'autre. Le brin d'ADN des *oligonucléotides chimériques* est parfaitement complémentaire de la séquence correcte du gène au site de la mutation ponctuelle du gène, tandis que la portion d'ARN est parfaitement complémentaire de la séquence mutée. Cela entraîne la formation de structures appariées en quadruplex, des quadruples brins, qui sont capables de corriger une si petite mutation en activant les mécanismes cellulaires naturels de réparation de l'ADN.

Avec cette technique, un oligonucléotide d'ADN et d'ARN complémentaire de la mutation au site d'épissage du gène de la dystrophine chez le chien dystrophique GRMD a été injecté à un chien de 6 semaines affecté de la maladie. Le muscle traité a présenté (1) des signes de restauration de l'exon qui était absent du fait de la mutation, (2) la restauration de la région de la protéine codée par l'exon manquant dans la protéine complète, dont il a été observé qu'elle était localisée correctement dans la membrane du muscle, et (3), fait très important, la démonstration que ce gène sur le chromosome X avait été corrigé. La réparation de la mutation s'est maintenue pendant presque une année chez ce chien (*Bartlett, Bethesda*).

Réparation du gène chez la souris mdx: Dans une expérience similaire, la mutation ponctuelle dans l'exon 23 de myoblastes de souris mdx a été réparée *in vitro* et ces myoblastes ont ensuite fusionné en myotubes qui ont produit de la dystrophine normale complète. Deux semaines après une injection unique d'oligonucléotides dans les muscles de souris mdx, de 1 à 2% des fibres se trouvant autour du

site d'injection contenaient de la nouvelle dystrophine, qui n'était pas de la dystrophine produite par réversion, c'est-à-dire de la dystrophine normale résultant d'une suppression spontanée de la mutation. Cette quantité de dystrophine nouvelle est restée stable pendant 10 semaines au moins (*Rando*, Palo Alto).

Omission d'exon: On tente au moyen de cette technique de transformer une mutation de Duchenne en une mutation de Becker. Cela peut se faire par induction du mécanisme d'épissage, qui élimine les introns de l'ARN pré-messager, afin d'éliminer également un *exon spécifique* après qu'une mutation ponctuelle ou une délétion a décalé le cadre de lecture et provoqué ainsi une interruption prématurée de lecture. L'objectif de cette approche est de restaurer le cadre de lecture perturbé.

Le gène avec sa mutation n'est pas modifié par l'*omission d'exon*, seul l'ARN messager, l'ARNm, ne contient plus l'information de l'exon omis. L'ARNm étant plus court que la normale, la protéine de dystrophine est également plus courte, elle contient moins d'acides aminés. Si les acides aminés manquants font partie de la région centrale de la dystrophine, ils ne sont pas essentiels et la protéine plus courte qui en résulte peut encore jouer son rôle stabilisateur au niveau de la membrane de la cellule musculaire. Le résultat en sera un passage des graves symptômes de la dystrophie de Duchenne aux symptômes beaucoup plus légers de la dystrophie musculaire de Becker.

Élimination de la mutation de la souris mdx: Cette approche a été utilisée pour contourner le défaut d'un seul nucléotide, la mutation ponctuelle dans l'exon 23 de la souris mdx. Un *oligonucléotide antisens*, consistant en 20 unités de nucléotides complémentaires de la séquence d'ARN du pré-ARNm, dans la région qui va de l'exon 23 à l'intron 23, a induit l'omission de l'exon contenant la mutation pendant le processus d'épissage. L'information génétique de l'exon 23 du gène, qui code pour 71 acides aminés dans le domaine en bâtonnet, a été ainsi *omise* durant le processus de lecture.

Cet oligoribonucléotide antisens, ainsi que d'autres aussi étudiés, ont été modifiés chimiquement, par exemple en protégeant les groupes OH normalement libres et sensibles des unités de ribose de l'ARN par des groupes méthyle (-CH₃). Environ 5 microgrammes (millionièmes de grammes) de ces "médicaments géniques" potentiels stabilisés ont été injectés avec le détergent F127 dans les muscles de la patte de souris mdx vivantes. Au bout de deux à quatre semaines, près de 20 % des fibres musculaires contenaient une quantité quasi normale de dystrophine légèrement raccourcie. Et, avec les autres constituants du complexe de la dystrophine, celle-ci se trouvait bien sur la membrane cellulaire. La force du muscle a été nettement augmentée, sans toutefois être entièrement normale. La répétition du traitement a eu pour effet une augmentation du nombre de fibres musculaires contenant de la dystrophine sans rejet immunitaire (*Wilton*, Perth, *Partridge*, Londres).

Omission d'exon dans l'ARNm de la dystrophine humaine: L'exon 45 du gène de la dystrophine est l'exon le plus fréquemment supprimé chez les garçons atteints de la maladie de Duchenne. Cette délétion entraîne un déplacement du cadre de lecture dans l'ARNm et l'apparition d'un codon stop prématuré, dont la conséquence est une protéine de dystrophine tronquée et non fonctionnelle qui est ensuite dégradée dans les cellules musculaires. Toutefois, si les exons 45 et 46 sont *tous deux* supprimés, le cadre de lecture n'est pas perturbé, il n'est pas déplacé, et le résultat en est une dystrophine plus courte que la normale dans laquelle il manque une suite de 108 acides aminés non essentiels dans la partie centrale de la protéine. Les patients qui portent ce type de mutation présentent les symptômes plus légers de la dystrophie musculaire de Becker.

Des expériences *in vitro* visant à la suppression spécifique de l'exon 46 dans le pré-ARNm de la dystrophine dans des myotubes de souris mdx ont été menées avec succès au moyen de 4 oligonucléotides antisens d'ARN différents et complémentaires d'une séquence spécifique régulatrice de l'épissage située *au sein* de l'exon 46. Avec ces oligonucléotides, on bloque une *séquence de reconnaissance d'exon* (ERS) ou un *activateur d'épissage exonique* (ESE), structures nécessaires au processus d'épissage, la jonction des exons dans l'ARNm.

Des expériences *in vitro* similaires ont alors été effectuées avec plusieurs oligonucléotides antisens d'ARN du site d'épissage analogue de l'exon 46 humain. Avec l'un d'entre eux, composé de 19 nucléotides, il a été possible de supprimer l'exon 46 dans environ 15% du pré-ARNm de la dystrophine, dans des myotubes obtenus à partir de deux patients atteints de la maladie de Duchenne qui présentaient une délétion de l'exon 45 (on trouvera à la dernière page de ce rapport les détails au niveau moléculaire de cette expérience).

Ce pourcentage d'ARNm raccourcis ne contenant pas les exons 45 et 46 a entraîné la formation de quantités normales de dystrophine raccourcie dans 75% des myotubes au moins. Après 16 heures, on a pu détecter cette nouvelle dystrophine dans les cellules, mais après 48 heures, elle s'était déplacée vers la membrane cellulaire où elle est restée une semaine au moins. La réapparition de la dystrophine a entraîné la restauration du complexe de la dystrophine dans - et sous la membrane de la cellule musculaire. Entre temps, le cadre de lecture a pu être corrigé dans des préparations *in vitro* de muscles de six autres patients victimes de délétions différentes et d'une mutation ponctuelle.

Cette technique s'est avérée hautement spécifique, ne produisant la suppression que du seul exon visé. Avec la même technique, il a été possible d'omettre 18 autres exons dans des cellules musculaires en culture. *Ainsi, cette stratégie très prometteuse, dont la validité a été démontrée par des expériences en éprouvette, pourrait ultérieurement permettre la conversion des mutations Duchenne en mutations Becker chez plus de 65% des patients présentant des délétions.*

On étudie actuellement diverses méthodes pour transférer les oligoribonucléotides antisens dans un organisme vivant. A cet effet, on conduit des expériences sur des souris vivantes qui ont dans leurs muscles, à la place de leur propre gène de la dystrophine, le gène humain, lui-même altéré par des délétions "humaines". La conduite d'essais cliniques chez des garçons atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne ne pourra être envisagée qu'après que ces études sur souris "humanisées" auront donné des résultats positifs.

Comme on connaît dans tous ses détails la structure du gène de la dystrophine, il est déjà possible de déterminer l'exon à omettre pour restaurer le cadre de lecture après une délétion ou une mutation ponctuelle particulière. Pour l'instant, une telle détermination n'est que purement théorique. Il n'est pas certain que les résultats obtenus sur des cellules en culture ou sur des souris seront les mêmes sur des garçons atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne, et il n'est pas davantage certain que la dystrophine restaurée mais raccourcie puisse, dans un cas donné, conduire aux symptômes d'une dystrophie musculaire de Becker (*van Ommen, van Deutekom, Leiden*).

Les sites d'épissage sont des séquences d'ARN spécifiques aux extrémités des exons, qui sont essentielles pour une élimination correcte des séquences introniques non codantes à partir du pré-ARNm. Cet ARN *pré-messenger* est le premier produit d'un gène actif; après élimination des séquences introniques par épissage, il devient l'ARN messenger, ARNm, qui se déplace vers les ribosomes où il agit comme porteur d'information pour la synthèse des protéines.

Omission d'exon avec des oligonucléotides produits localement: Dans une autre technique d'omission des exons, les oligoribonucléotides antisens n'ont pas besoin d'être injectés, mais sont synthétisés dans le noyau lui-même des cellules, là où on a besoin d'eux, après transfert de leur gène. Les séquences d'introns sont séparées du pré-ARNm dans le noyau cellulaire par des organelles d'épissage. Ce sont des structures complexes faites de plusieurs protéines et petits ARN nucléaires (ARNsn), qui reconnaissent les limites exon-intron et qui joignent les exons après épissage avec précision et sans déplacement du cadre de lecture.

Les ARNsn U7 sont quelques uns de ces ARN très courts. Ils se lient aux sites d'épissage sur des séquences de reconnaissance particulières dans le pré-ARNm, bloquent l'épissage d'exons spécifiques et s'assurent ainsi que plusieurs protéines de différentes longueurs sont produites par un seul gène. Les ARNsn U7 régulent normalement les processus d'épissage de l'ARNm des histones. Les histones sont des protéines nécessaires pour emballer l'ADN dans les chromosomes.

Pour cette nouvelle méthode, des ARNsn U7 ont été génétiquement modifiés de sorte qu'ils ne se sont plus liés au pré-ARNm de l'histone, mais seulement aux sites d'épissage dans la région de l'exon 23 du pré-ARNm de la dystrophine de souris. Pour y parvenir, on a emballé ensemble un gène codant pour les ARNsn U7 modifiés et un promoteur de la CK dans des plasmides servant de vecteurs puis, dans une expérience de laboratoire, transférées dans des myoblastes isolés de la souris. Ces cellules se sont ensuite différenciées en cellules musculaires en milieu de culture.

Dans les noyaux des myoblastes transgéniques, le gène transféré a donné naissance à des ARNsn U7 modifiés. Ceux-ci avaient de nouvelles séquences de reconnaissance et étaient liés, avant et après l'exon 23 du pré-ARNm de la dystrophine, à des sites importants pour l'épissage. Ainsi donc, ces sites d'épissage étaient bloqués et l'exon 23 était emmené avec les introns au cours de l'épissage du pré-ARNm (omission d'exon). Comme la mutation ponctuelle des souris mdx est située dans l'exon 23, le retrait de cet exon a eu pour conséquence que les cellules musculaires mdx, incapables de produire de la dystrophine normale, se sont alors mises à fabriquer une protéine dystrophine légèrement

raccourcie localisée sur son site correct sous la membrane cellulaire.

Le but de cette expérience génique *in vitro* fondamentale - à l'extérieur de la souris vivante - était de démontrer que les cellules musculaires elles-mêmes étaient capables de produire les oligoribonucléotides antisens thérapeutiques.

Pour une application sur l'homme, il faudrait utiliser des ARNs U7 adaptés à la mutation spécifique du patient, et leur gène transporté avec un vecteur thérapeutique de gène dans les noyaux cellulaires des fibres musculaires. Une alternative serait un transfert *ex vivo* dans lequel les gènes ARNs U7 seraient transportés dans des cellules satellites ou d'autres cellules souches musculaires puis injectés dans la circulation sanguine ou directement dans les muscles. Comme les gènes ARNs U7 sont très courts, ce transfert devrait être probablement plus facile que le transfert de l'ADNc de la dystrophine entière ou raccourcie, tel qu'il est actuellement expérimenté avec d'autres méthodes (*Weis, Berne; Lochmüller, Munich*).

Recombinaison homologue: La mutation ponctuelle dans le gène de la dystrophine des souris mdx a pu être réparée dans 15 à 20% des myoblastes isolés, par le biais de l'addition d'un ADN de 603 nucléotides dont la séquence était la même de part et d'autre de la mutation de l'exon 23 des souris, mais ne contenait pas l'échange C-à-T de la mutation. Une partie du nouveau segment de gène a été échangée contre le segment homologue contenant la mutation C-à-T dans l'exon 23 des souris. Cette technique dite de *recombinaison homologue d'un fragment court*, SFHR, a été ensuite appliquée à des myoblastes isolés provenant d'un patient atteint de la maladie de Duchenne présentant une mutation de délétion dans l'exon 13 (*Kapsa, Melbourne*).

Des antibiotiques pour ignorer un codon stop prématuré: Près de 5% des garçons atteints de la maladie de Duchenne ont une mutation ponctuelle dans leur gène de la dystrophine qui a changé le mot de code pour un acide aminé en l'un des trois codons stop, TGA, TAG et TAA, endroits où, après la transcription en ARNm, la synthèse de dystrophine s'arrête de façon prématurée.

La *gentamicine* est un antibiotique qui fait en sorte que le mécanisme de traduction de l'ARN ignore de tels codons stop prématurés et *continue donc la lecture au-delà du codon stop*. Les codons stop normaux, qui sont protégés par une structure tridimensionnelle particulière, seront néanmoins utilisés comme auparavant. Chez la souris mdx, l'on a obtenu de cette manière jus-qu'à 20% de la quantité normale de dystrophine nouvelle et fonctionnelle. La gentamicine présente l'avantage d'être un médicament bien connu dont l'utilisation comme traitement de la dystrophie musculaire ne nécessiterait pas de longues procédures d'autorisation (*Sweeney, Philadelphie*).

Pour confirmer ces résultats positifs, deux autres études sur des souris mdx ont été effectuées, qui ont cependant montré que dans des conditions semblables, on n'a pu détecter *aucune* dystrophine nouvelle après traitement à la gentamicine (*Karpati, Montréal; Lochmüller, Munich*).

Deux études cliniques avec la gentamicine ont été faites chez des garçons atteints de la dystrophie de Duchenne qui n'ont pas non plus donné de dystrophine nouvelle. Il est possible que la période d'essai de 14 jours ait été trop brève pour que des effets positifs sur la synthèse de dystrophine aient pu se manifester. C'est la raison pour laquelle un autre essai plus long portant sur 36 patients est actuellement en cours (*Mendell, Columbus*).

Remplacement de la dystrophine

L'utrophine est une protéine musculaire présente, elle aussi, en petites quantités, chez les personnes atteintes de la maladie de Duchenne.

Présente en grandes quantités, elle pourrait reprendre la fonction de la dystrophine.

Activation de l'utrophine: L'utrophine est une protéine très semblable à la dystrophine dans sa structure et sa fonction. Chez l'homme, son gène est situé sur le chromosome 6, il contient 75 exons et a une longueur de 1 million de nucléotides environ. La protéine utrophine est plus courte que la dystrophine d'environ 7%. On la trouve dans de nombreux tissus du corps et aussi dans le muscle, mais elle y est concentrée dans les régions où les motoneurons entrent en contact avec la membrane du muscle. Avant la naissance, la concentration d'utrophine dans le muscle est beaucoup plus élevée que par la suite. Cette protéine, bien qu'elle ne soit présente qu'en petites quantités, atténue les symptômes de la dystrophie de Duchenne, moins sévères qu'ils ne seraient si l'utrophine était aussi absente. En fait, les souris mdx dont le gène de l'utrophine a été *invalidé* expérimentalement, et qui n'ont donc ni

dystrophine ni utrophine, ont des symptômes type Duchenne et meurent précocement, contrairement aux souris mdx "normales" dont les muscles ne dégèrent pas.

Des expériences effectuées chez la souris ont montré que, si elle est présente en quantités suffisantes, l'utrophine peut remplacer la dystrophine. Les souris utilisées étaient des souris transgéniques dont la lignée germinale contenait des mini-gènes d'utrophine introduits par une technique qui ne peut pas être utilisée chez l'homme. On a élevé d'autres souris transgéniques qui ne produisent de l'utrophine que si l'eau qu'elles boivent contient l'antibiotique tétracycline. Cette augmentation de la quantité d'utrophine a empêché l'apparition de symptômes de Duchenne; cet effet a été plus marqué chez les souris nouveau-nées que chez celles âgées de 10 ou 30 jours.

Pour une éventuelle thérapie de la maladie de Duchenne, une autre stratégie est appliquée, qui consiste à augmenter les quantités normalement basses d'utrophine par une *augmentation* de l'activité de son gène. A cet effet, une substance activatrice est requise, qui pourrait être un médicament connu ou une autre substance chimique naturelle.

Grâce à des systèmes automatiques de tests in vitro, des milliers de composés chimiques, dont certains sont produits automatiquement par chimie combinatoire, sont testés en laboratoire sur des cultures de cellules de souris mdx pour leur capacité à activer l'expression du gène de l'enzyme luciférase, qui est précédé de deux promoteurs du gène de l'utrophine. Cet enzyme, extrait des lucioles, produit de la lumière et est plus facile à déceler que l'utrophine. Tout positif, c'est-à-dire tout composé actif dans ces tests préliminaires, sera encore modifié, puis, toutes ces substances similaires examinées, tout d'abord sur des cultures de cellules musculaires puis, si elles réagissent positivement, sur des souris mdx vivantes pour leur potentiel d'activation du gène de l'utrophine. Ce n'est qu'après qu'on aura trouvé une ou plusieurs substances actives que des essais cliniques sur des personnes atteintes de la dystrophie musculaire de Duchenne pourront commencer, c'est-à-dire dans quelques années (Davies, Oxford).

Un tel activateur de l'expression du gène de l'utrophine pourrait, s'il est une molécule de petite taille, être administré au travers de la circulation sanguine et atteindre tous les muscles. De plus, le système immunitaire reconnaîtrait l'utrophine additionnelle comme une substance endogène puisque déjà présente en petites quantités chez les garçons atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne et il n'y aurait donc pas de problèmes de rejet.

Cependant, une substance qui active le gène de l'utrophine pourrait faire de même avec d'autres gènes, aussi. Par conséquent, avant de tester un tel activateur chez l'enfant, il faudra s'assurer que l'application thérapeutique ultérieure ne produira pas d'effets secondaires indésirables.

Autres tentatives d'augmenter la quantité d'utrophine: Le transfert d'un gène raccourci de l'utrophine au moyen d'adénovirus à des *chiens dystrophiques* a fourni de l'utrophine qui a pu reprendre la fonction de la dystrophine manquante. --- Les *glucocorticoïdes*, et parmi eux la prednisone, peuvent activer dans une certaine mesure le gène de l'utrophine. --- De tels corticoïdes ont aussi été extraits de *plantes médicinales chinoises* utilisées traditionnellement contre la dystrophie musculaire. --- Une faible *inflammation* chronique dans des muscles de souris mdx entraîne une augmentation marquée de l'expression d'utrophine dans des régions membranaires éloignées des endroits où les motoneurones les touchent. --- La *L-arginine*, un acide aminé, peut augmenter la quantité d'utrophine chez la souris mdx et soulager notablement les symptômes dystrophiques. L'enzyme *synthase de l'oxyde nitrique* utilise l'arginine pour produire l'oxyde nitrique, un gaz à activité biologique. Mais comme l'oxyde nitrique est aussi actif dans d'autres processus biologiques, il n'est pas possible d'employer l'arginine pour la thérapie de la maladie de Duchenne sans autres investigations complémentaires. --- La petite protéine *hereguline*, avec laquelle les motoneurones stimulent le développement musculaire, peut aussi considérablement soulager les symptômes des souris mdx. --- Une extrémité de l'ARNm de l'utrophine n'est pas traduite en protéine, mais se lie à des structures dans les zones de contact avec les nerfs, limitant ainsi l'utrophine à ces sites. Si un médicament pouvait empêcher cette liaison, il serait possible d'avoir une distribution plus homogène de l'utrophine sur l'ensemble de la membrane musculaire de manière à ce qu'elle remplace mieux la dystrophine. --- Une autre forme très similaire d'utrophine, l'*utrophine B*, a été découverte récemment dans les vaisseaux sanguins. Mais seule la forme "normale", l'utrophine A, se trouve dans les muscles et peut compenser partiellement la dystrophine manquante après activation de son gène.

Autres protéines

Les mutations du gène de la dystrophine et l'absence de dystrophine influent sur l'activité de nombreux autres gènes.

Activité de milliers de gènes de muscles: Pour pouvoir mesurer simultanément l'activité d'un très grand nombre de gènes dans un échantillon de tissu en une seule expérience, on utilise des *puces à ADN*. Comme la quasi totalité des séquences de gènes humains est connue, il est possible de produire automatiquement des segments courts de milliers de gènes et de les déposer avec un robot suivant un certain patron sur une plaquette de quartz de quelques centimètres carrés. Si des copies biochimiques d'ADN des ARNm de tous les gènes actifs sont déposées sur la plaquette pour servir d'échantillon à analyser, des points lumineux apparaîtront aux endroits de cette plaquette où se trouvent des séquences d'ADN complémentaires de ces gènes actifs. L'intensité lumineuse de ces points est mesurée automatiquement, ce qui permet alors de déterminer quels gènes sont actifs et à quel degré, et quels sont ceux qui ne le sont pas.

Avec ce *profilage d'expression*, plusieurs milliers de gènes ont été testés dans des échantillons de muscles prélevés sur des souris normales et mdx, sur des garçons bien portants et des dystrophiques de Duchenne, sur des souris transgéniques qui n'avaient ni leur propre dystrophine ni utrophine, ainsi que sur d'autres souris qui avaient par contre de la dystrophine humaine dans leurs muscles.

Les résultats ont montré que l'absence de dystrophine provoquait l'augmentation et la diminution de l'activité de nombreux gènes de muscles. Toute une série de gènes responsables de la production d'énergie dans les cellules musculaires ont été moins actifs chez les souris sans dystrophine ni utrophine, c'est-à-dire que leurs muscles étaient victimes d'une pénurie d'énergie qui a contribué à la dégénérescence de leurs muscles dystrophiques. D'un autre côté, de nombreux gènes nécessaires au développement et à la réparation de muscles ont vu leur activité augmenter, parfois d'un facteur cent, ils étaient activés par le cours de la maladie. Des résultats similaires ont été obtenus avec des échantillons de muscles humains.

D'autres expériences ont montré que, chez la souris, de nombreux autres gènes étaient activés, des gènes qui sont impliqués dans le développement de structures de surface, dans la production de signaux pour la synthèse des protéines, dans l'intensification des réactions immunitaires et dans d'autres processus responsables pour les symptômes de la dystrophie musculaire des souris mdx. Chez les personnes atteintes de la maladie de Duchenne, ces changements ont été moins prononcés et, chez la souris transgénique avec dystrophine *humaine*, l'activité de ces gènes a été normale parce qu'elles n'avaient plus de dystrophie musculaire.

Après que ces premiers résultats ont été obtenus, il y a quelques années, beaucoup d'autres expériences ont été effectuées avec cette nouvelle technique pour répondre à d'autres questions que pose la recherche sur la dystrophie musculaire de Duchenne. Leurs résultats, et tous ceux à venir, permettront de comprendre la relation complexe entre les nombreux éléments de l'architecture musculaire et ses changements lorsqu'un de ses composants les plus importants, la dystrophine, est absente. Ceci ouvrira de nouvelles perspectives pour le développement d'un traitement de la maladie de Duchenne (*van Ommen*, Leiden; *Kunkel*, Boston; *Hoffman*, Washington, et d'autres).

Un ver dystrophique: *Caenorhabditis elegans* est un ver transparent long de 0,9 millimètres, beaucoup utilisé par les chercheurs en génétique parce que ses 19.733 gènes sont connus, de même que les 959 cellules de son corps, dont 95 sont des cellules musculaires. Ses muscles possèdent une dystrophine similaire à celle de l'homme, qui peut aussi subir des mutations entraînant des symptômes dystrophiques.

Certains gènes ont été inactivés, mais aussi activés, de manière à ce qu'on puisse étudier les symptômes dystrophiques provoqués par l'absence ou l'augmentation de l'activité du gène. Par exemple, on a pu montrer que l'activation de la *dystrobrévine*, une forme extrêmement courte de dystrophine, a ralenti fortement la dégénérescence musculaire. D'autres investigations contribueront à une meilleure compréhension de relations moléculaires encore inconnues qui accompagnent le développement de la dystrophie musculaire (*Ségalat*, Lyon).

Intégrines et syntrophines: Les *intégrines* constituent une famille de protéines situées dans la membrane des cellules musculaires. Elles sont nécessaire à la fusion des myoblastes en myotubes et au développement des myotubes en cellules musculaires parvenues à maturation. Elles participent aussi à la propagation des signaux de cellule à cellule.

Chez la souris gravement dystrophique, qui n'a ni dystrophine ni utrophine, la quantité de l'une de ces intégrines a été multipliée par deux environ par transfert génique. Cette manipulation a multiplié par trois l'espérance de vie des souris tandis que leurs symptômes dystrophiques se sont nettement améliorés (*Kaufman, Urbana*).

Les cinq syntrophines connues sont des protéines qui jouent le rôle d'intermédiaires dans l'interaction de protéines de signalisation avec les complexes de dystrophine et d'utrophine au niveau de la membrane cellulaire du muscle. Une meilleure compréhension de cet effet aura des conséquences sur la thérapie par l'utrophine (*Froehner, Seattle*).

Stratégies pharmacologiques

Les corticostéroïdes et d'autres médicaments peuvent avoir un effet positif sur les symptômes de la dystrophie musculaire de Duchenne sans toutefois guérir la maladie elle-même.

Tant que les efforts consacrés au transfert d'un gène de la dystrophine fonctionnel ou à la réparation du gène endommagé n'auront pas abouti à un traitement, on essaiera de soulager au moins les symptômes de la dystrophie de Duchenne par un traitement médicamenteux. Cette approche a enregistré quelques résultats positifs.

Myostatine: Les vaches Blanc-Bleu belges existent depuis près de 200 ans, elles ont 20% de masse musculaire de plus que les animaux normaux. Il y a six ans, on a découvert que ces vaches possédaient une délétion de 11 nucléotides dans le gène de la *myostatine*, une protéine. Les souris transgéniques dépourvues du gène de la myostatine sont deux à trois fois plus lourdes que les souris normales, non pas parce qu'elles ont davantage de cellules musculaires, mais parce que leurs cellules musculaires sont beaucoup plus grandes. La myostatine est une protéine signal, une sorte d'hormone, constituée de 375 acides aminés et nécessaire pour limiter la masse musculaire.

Les muscles et leurs cellules précurseurs fabriquent cette protéine que les muscles modifient ensuite: les deux tiers de la chaîne d'acides aminés sont éliminés et deux des chaînes de 109 acides aminés restantes forment un cycle double. Cette *myostatine active* inhibe la croissance des cellules musculaires en influençant négativement sur la régulation génique des cellules précurseurs myogéniques. D'autres facteurs sont aussi impliqués dans l'optimisation de la masse musculaire.

Ces observations ont conduit à l'idée qu'on pourrait rendre plus gros les muscles des enfants atteints de la maladie de Duchenne, ou tout au moins à réduire leur destruction en bloquant l'activité de la myostatine. On a donc fabriqué des anticorps monoclonaux, c'est-à-dire des protéines qui ont la propriété de se fixer très spécifiquement sur la myostatine et, ainsi, de l'inactiver. Ces anticorps ont été injectés sous le diaphragme de souris mdx à raison d'une fois par semaine. Au bout de trois mois, les animaux traités étaient de 12% plus lourds que les animaux non traités servant de contrôles parce que leur masse musculaire avait augmenté. En outre, leurs muscles fonctionnaient mieux, ils pouvaient mieux se cramponner à un barreau de verre qui tournait, la dégénérescence de leurs muscles s'était ralentie et les activités de la CK étaient quasiment normales.

D'autres expériences sur la souris sont en cours actuellement. Elles devront être répétées sur des chiens dystrophiques dont la maladie ressemble davantage à la dystrophie des humains que la dystrophie de la souris. Ce n'est que lorsqu'on aura obtenu des résultats positifs que pourront débiter des essais sur des patients victimes de la dystrophie musculaire de Duchenne.

Cette méthode ne constituera *pas* un traitement curatif de la dystrophie musculaire de Duchenne parce qu'elle n'éliminera pas la cause génétique de la maladie. Mais, comparée à d'autres méthodes, elle aura les avantages suivants: aucun problème de rejet ni de toxicité, aucun danger génétique présenté par les virus et fabrication aisée du médicament. Des sociétés pharmaceutiques s'intéressent déjà à cette méthode parce qu'une augmentation de la masse musculaire serait importante pour les personnes âgées et pour les personnes souffrant d'autres dégénérescences musculaires (*Khurana, Philadelphie*).

Glucocorticoïdes: On ignore encore pourquoi la prednisone, la prednisolone, qui lui est très similaire, et le deflazacort retardent la dégénérescence musculaire. Si une partie de leur effet repose probablement sur leur action anti-inflammatoire, d'autres mécanismes d'action sont également possibles. En analysant l'activité de plus d'un millier de gènes chez la souris mdx traitée à la prednisone, au moyen de la nouvelle technique des micro-matrices d'ADN, il a été trouvé qu'environ 5% des gènes

présentaient une réduction ou une augmentation de leur activité. La poursuite de l'analyse du patron d'expression génique induit par les glucocorticoïdes aidera à comprendre le mécanisme moléculaire de l'action des glucocorticoïdes dans le muscle squelettique. A son tour, cette connaissance pourrait contribuer au développement d'un traitement plus spécifique, mais moins toxique, avec ces médicaments. (*Muntoni*, Londres).

Créatine: Une autre substance qui pourrait peut-être ralentir la dégénérescence musculaire est la *créatine*, un composé naturel utilisé en grandes quantités par les athlètes pour améliorer leurs performances. Sous sa forme phosphorylée, la phosphocréatine, la créatine fournit de l'énergie non seulement pour la contraction musculaire mais aussi pour l'élimination du calcium superflu, une des causes de la destruction des cellules musculaires. Des expériences effectuées chez la souris mdx ont montré que la supplémentation en créatine améliore la santé du muscle et pourrait fournir une base scientifique pour son utilisation comme thérapie de soutien dans la dystrophie de Duchenne (*Wallimann*, Zurich; *Rüegg*, Lausanne).

Autres essais pharmacologiques: Des extraits de *thé vert* dans la nourriture de souris mdx ont ralenti le processus dégénératif de quelques uns de leurs muscles, peut-être parce que ce thé contient des substances antioxydantes. --- On a élevé des souris transgéniques qui ont produit dans leurs muscles la protéine *muscle insulin-like growth factor 1* (mIGF1) en quantités relativement importantes. Le résultat a été une augmentation de 40% de la masse musculaire et une diminution de la fibrose et de la dégénérescence musculaire, ainsi qu'une amélioration significative de la régénération. --- La *leupeptine* est un tripeptide composé de trois acides aminés partiellement modifiés. Associé à la carnitine il inhibe l'enzyme calpaïne, qui détruit les protéines dans les cellules musculaires si du calcium y entre de manière incontrôlée, comme dans la dystrophie de Duchenne. Dans des expériences effectuées chez le singe et la souris, la dégénérescence musculaire a été freinée de manière significative par la leupeptine. --- La concentration de l'enzyme *synthase de l'oxyde nitrique* dans le complexe de la dystrophine est diminuée de manière significative chez la souris mdx. C'est pourquoi, son produit, l'oxyde nitrique gazeux biologiquement actif, ne peut plus remplir sa fonction, ce qui contribue à la dégénérescence musculaire. Des souris mdx transgéniques avec de la synthase de l'oxyde nitrique en quantité normale ont présenté moins de symptômes de dystrophie. --- Chez la souris mdx, la protéine de signalisation JNK1 est activée, ce qui contribue à la dégénérescence des cellules musculaires. L'injection intramusculaire directe de la protéine inhibitrice naturelle JIP1, emballée dans des adénovirus, ralentit la destruction des fibres musculaires car JIP1 interfère avec JNK1. --- Une protéine, la *galectine-1*, participe aux processus qui conduisent à des tissus musculaires nouveaux et régénérés. Les fibroblastes obtenus à partir de la peau de souris nouveau-nées se différencient en cellules musculaires avec dystrophine s'ils poussent en milieu de culture tissulaire contenant de la galectine-1. Ces fibroblastes de peau pourraient facilement être prélevés chez un patient atteint de la maladie de Duchenne, transformés en cellules musculaires avec de la galectine-1, puis modifiés génétiquement pour synthétiser de la dystrophine normale et finalement être transplantés chez le patient dont ils proviennent.

Etudes cliniques avec des garçons atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne

Le premier essai avec transfert de gènes et un nouvel essai avec myoblastes ont débuté. Corticostéroïdes, créatine et autres substances chimiques sont à l'étude. Une vaste étude sur la prednisone et la cyclosporine est en préparation.

Des études cliniques avec des enfants atteints de la maladie de Duchenne seront de plus en plus nécessaires au vu du nombre croissant de résultats positifs obtenus chez l'animal de laboratoire. Ces études cliniques sur l'homme devront être effectuées en plusieurs étapes, dont la première, la *phase I*, prendra déjà plusieurs années: il s'agira de démontrer que le nouveau traitement ne s'accompagne pas d'effets secondaires inacceptables. Ce n'est qu'après, que d'autres études sur des enfants malades pourront être initiées pour vérifier si le traitement augmente vraiment ou maintient la force musculaire (études de *phase II*) et pour déterminer quelle sera la dose optimale (études de *phase III*).

Toutes ces études doivent être effectuées sous la forme d'essais en *double insu*, dans lesquels seule une moitié des patients reçoit la substance testée alors que l'autre moitié reçoit un composé inactif, un

placebo, et ni les patients ni les chercheurs ne savent à quel groupe appartiennent les patients jusqu'au terme de l'essai, lorsque l'on dévoile le code et que les résultats sont analysés. Ces études et les procédures d'autorisation prennent du temps, elles demandent de nombreuses années et leur réalisation coûte cher.

Transfert du gène de la dystrophine à l'aide de plasmides: La première phase du premier essai de transfert de gènes sur des patients atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne s'est terminée au début 2003. La société de biotechnologie *Transgène*, à Strasbourg, en collaboration avec l'AFM, Association française contre les myopathies, a commencé en 1995 la préparation de cette thérapie génique. L'autorisation pour ce premier essai chez l'homme a été donnée par les autorités françaises en novembre 1999 et les premières injections de vecteurs faites en septembre 2000 à l'*Hôpital de la Pitié Salpêtrière* à Paris.

Les 9 garçons qui y ont participé étaient tous âgés de plus de 15 ans, de sorte qu'ils ont pu donner leur *consentement éclairé*. Ils n'ont pas retiré de bénéfice clinique de ce traitement, *ce n'était pas encore une thérapie*.

Après avoir testé plusieurs méthodes de transfert de gènes sur des souris et des chiens dystrophiques, il a été décidé d'utiliser tout l'ADNc du gène d'une dystrophine de pleine longueur emballé dans un *plasmide* servant de vecteur en compagnie d'un puissant promoteur tiré d'un virus. Les plasmides présentent l'avantage de ne contenir aucune protéine et ne devraient donc provoquer aucune réaction immunitaire. Le gène thérapeutique à transporter n'a pas non plus de protéine, c'est de l'ADN pur, ou *nu*.

D'autres essais préliminaires, avec des cultures de cellules musculaires et des souris, ont montré que ce vecteur donnait naissance à de la nouvelle dystrophine à l'endroit correct, sous la membrane de la cellule musculaire des animaux, qu'il restaurait le complexe dystrophine-glycoprotéine et qu'il prolongeait la vie des cellules.

L'objectif de cette étude était d'établir la sécurité du procédé, c'est-à-dire de déterminer s'il y aurait une inflammation ou un rejet immunitaire et si de la dystrophine nouvelle et normale se retrouvait en bonne place dans les fibres musculaires ayant reçu le plasmide.

Une solution contenant 0,2 mg de plasmide avec 1 billion (10^{12}) de copies du gène de la dystrophine a été injectée dans un muscle de l'avant-bras des 3 premiers patients. Il s'agit d'une très petite quantité de matériel génétique par rapport aux expériences chez l'animal. Les 3 patients suivants ont reçu une dose de 0,6 mg et les 3 derniers ont reçu chacun deux doses de 0,6 mg à deux semaines d'intervalle. La sécurité pour les patients a été le souci principal et, par conséquent, chaque patient n'a été traité que lorsque l'on a été certain que le patient traité précédemment ne présentait pas de signes d'intolérance immunitaire.

Trois semaines après ces injections, la surface musculaire traitée (environ $0,5 \text{ cm}^3$) a été extraite par biopsie pour en rechercher la dystrophine. Chez trois des six garçons des deux premiers groupes, et chez tous les garçons du troisième groupe, de la nouvelle dystrophine était présente dans moins de 1 % à plus de 25 % des fibres musculaires qui entouraient les sites d'injection. Il n'y a eu aucun signe de rejet, ni contre le plasmide, ni contre la dystrophine nouvellement produite. Ceci était la réponse à la question de l'étude de phase I: *le transfert de gènes avec de l'ADN nu est une manipulation sûre*. Elle pourrait, après amplification, devenir un moyen thérapeutique, car on sait, par les essais chez l'animal, qu'une production de dystrophine dans 20 % environ des fibres musculaires améliorerait nettement la fonction musculaire.

Les chercheurs français travaillent actuellement avec l'équipe de *Jon Wolff* à Madison aux Etats-Unis, qui a injecté *sous pression* des constructions de plasmides similaires avec les gènes d'une protéine de marquage dans la circulation sanguine des membres de rats, de chiens et de singes. Ensuite, près de 40 % des fibres musculaires contenaient la protéine de marquage transférée.

L'étape suivante sera d'appliquer cette procédure d'administration par voie artérielle à des garçons atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne, probablement lors d'un essai clinique qui débutera en 2004. A ce stade, il est prévu de ne traiter qu'un petit muscle du pied, ceci toujours par mesure de sécurité. Si les résultats sont positifs, cette méthode sera essayée sur l'ensemble des muscles des jambes et des bras, ce qui pourrait être envisagé pour 2006.

Ensuite seulement, on pourra s'attaquer aux muscles respiratoires et du cœur. Pour des raisons de sécurité, il est impossible d'aller plus vite, parce qu'il serait catastrophique que se produisent des effets secondaires graves ou tout autre effet indésirable obligeant à interrompre cette étude et toutes les

autres expériences de thérapie génique (*Braun, Strasbourg*).

Etudes cliniques avec des myoblastes (transfert de myoblastes): Début 2003, a commencé à Québec City, au Canada, un essai clinique de phase I sur des enfants atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne avec délétions, âgés de 5 à 15 ans. Il devrait répondre à la question de savoir si le transfert de myoblastes normaux dans des conditions modifiées est sûr, c'est-à-dire s'il ne provoque pas de rejet ou d'inflammation de nature immunitaire, et si de la nouvelle dystrophine apparaît après le traitement.

La différence d'avec les essais infructueux des années quatre-vingt-dix est, d'une part, qu'on utilise FK506 (Tacrolimus), un inhibiteur de l'immunité plus efficace, au lieu de cyclosporine A et que, d'autre part, on n'injecte pas, comme précédemment, 60 à 90 millions de cellules dans tout le biceps, mais 30 millions de cellules dans le muscle tibial antérieur en applications multiples à un millimètre d'intervalle dans un volume musculaire d'un centimètre cube seulement. On n'attend aucune amélioration de la fonction musculaire. Comme pour l'essai français, les patients ne tireront *aucun bénéfice thérapeutique* de ces injections.

Un mois après la fin du traitement, on pratiquera une biopsie pour déterminer si de la dystrophine normale, de l'ADN, de l'ARNm et la protéine normale sont apparus et s'il y a eu la moindre réaction immunitaire. Jusqu'à juillet 2003, trois patients avaient été traités, l'essai complet devant être terminé avant la fin de 2003. Si les résultats sont positifs, l'essai sera poursuivi par une étude de phase II au cours de laquelle on transférera des myoblastes dans tout le biceps. Ensuite, durant les deux ans qui suivront, on mesurera la force musculaire, dont on espère qu'elle aura augmenté, ou qu'elle se sera du moins maintenue (*Trembley, Québec City*).

Prednisone et deflazacort: Seize études cliniques effectuées dans le monde entier ont démontré l'efficacité de dérivés de la cortisone, en particulier de la *prednisone*, pour réduire la perte de puissance musculaire chez les garçons atteints de la maladie de Duchenne. Il y a eu ensuite des indications suggérant qu'un nouveau corticoïde, le *deflazacort*, agirait de façon similaire mais avec moins d'effets indésirables.

De 1992 à 1997, une étude avec la participation de 14 centres allemands du muscle a été réalisée, dans laquelle on a comparé l'effet de maintien du muscle de ces deux médicaments avec l'histoire naturelle, bien documentée, de la maladie. Les doses utilisées ont été de 0,75 mg par kg de poids corporel et par jour pour la prednisone et de 0,9 mg par kg et par jour pour le deflazacort. Le résultat a été que les deux médicaments peuvent maintenir la force musculaire pendant deux à trois ans au moins et que, dans des cas isolés, ils peuvent prolonger la capacité de marcher jusqu'à la 14^{ème} année environ. L'effet secondaire le plus important de la prednisone a été une prise de poids chez environ 20 % des patients. Avec le deflazacort, de légères cataractes, un trouble de la lentille oculaire ont été plus fréquents qu'avec la prednisone. Les deux médicaments ont exercé un effet de ralentissement de la croissance, les autres effets secondaires ont été insignifiants. Après l'arrêt de la médication, la dégénérescence musculaire et la croissance normale ont repris.

Les résultats de l'étude ne permettent pas encore de décider du meilleur moment pour commencer le traitement, par exemple avant l'âge de cinq ans. Les patients qui souhaitent commencer ce traitement le feront dans le cadre d'une étude bien documentée, afin d'obtenir davantage d'information et de s'assurer les nombreux contrôles rendus nécessaires par les effets secondaires. L'étude faite en Allemagne est poursuivie en ouvert avec une documentation à long terme incluant des données de certains patients qui ont été traités pendant plus de sept ans (*Reitter, Mayence*). **Prednisolone:** Au Royaume-Uni, un vaste essai clinique de longue durée avait été mis sur pied avec pour but de déterminer si la prednisolone était capable de prolonger la déambulation et d'améliorer la qualité de vie. Un traitement intermittent, à raison de 10 jours avec et 10 jours sans médicament, avait été envisagé. Pour des raisons financières, il n'est possible que de faire une étude ouverte, et non en double insu, dans le but de documenter l'efficacité et les effets secondaires de ce traitement (*Muntoni, Londres*).

Association prednisone - cyclosporine A: On est en train de mettre sur pied en Allemagne un essai clinique qui débutera à fin 2003 et devrait répondre à deux questions: la *cyclosporine A* seule peut-elle augmenter la force musculaire à court terme? et l'association de la cyclosporine A et de la *prednisone* peut-elle réduire plus efficacement la perte de force musculaire à long terme que la prednisone seule, lorsque celle-ci est donnée de façon intermittente, soit selon un cycle comprenant 10 jours avec et 10

jours sans traitement? Comme les processus immunitaires jouent un rôle dans la dystrophie musculaire de Duchenne, des expériences antérieures ont montré que des immunosuppresseurs comme la cyclosporine A pourraient retarder la dégénérescence musculaire.

Pour obtenir des résultats fiables, il est nécessaire d'avoir la participation d'au moins 150 patients pour qui le diagnostic de la maladie de Duchenne est indubitable, qui ont plus de 6 ans et qui peuvent encore marcher 50 mètres seuls. Au cours de la première phase, qui durera trois mois, tous les enfants recevront 3,5 à 4 mg par kg et par jour de cyclosporine A seule, ou de galactose (sucre du lait) servant de placebo, ceci dans une procédure en double insu. Au cours de la seconde phase, qui durera douze mois, tous les enfants recevront *en plus* 0,75 mg par kg et par jour de prednisone pendant 10 jours suivis de 10 jours sans prednisone. Huit centres allemands du muscle participeront à cette étude (*Korinthenberg*, Fribourg-en-Brisgau).

Créatine: Une étude clinique contrôlée, dite en double insu, comprenant 8 patients atteints de la maladie de Duchenne, 10 patients atteints de la dystrophie de Becker et 18 patients présentant d'autres maladies musculaires, a montré, après 8 semaines d'administration journalière de 5 grammes d'hydrate de créatine pour les enfants et de 10 grammes pour les adultes, un effet bénéfique à court terme, léger mais significatif, sur la force musculaire et la performance, sans aucun effet secondaire. D'autres essais cliniques doivent être faits avant que l'on puisse recommander la créatine comme une médication préservant la muscle à long terme chez les enfants atteints de la dystrophie de Duchenne (*Walter*, Munich).

Au Canada, a débuté un essai visant à déterminer l'effet de la créatine impliquant 40 enfants atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne. --- En Belgique, la créatine a été testée pendant trois mois sur 12 patients atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne et 3 de Becker. Le résultat a été une légère augmentation de la force musculaire. **L'oxandrolone**, un stéroïde anabolisant parfois utilisé par les athlètes, a été testée dans une étude portant sur 51 garçons atteints de la maladie de Duchenne. Toutefois, la petite amélioration de la force musculaire observée ne justifie pas son utilisation comme médicament à la place de la prednisone ou le deflazacort (*Fenichel*, Nashville).

Etudes cliniques internationales: Dans le cadre du *Cooperative International Neuromuscular Research Group*, CINRG, des laboratoires des Etats-Unis, du Canada, de Belgique, d'Argentine, d'Australie et d'Inde sont en train de mener des études cliniques chez des garçons atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne, avec des substances choisies parmi 45 substances ayant donné des résultats positifs dans un programme de criblage sur la souris dystrophique.

Albuterol, un médicament contre l'asthme, a produit une augmentation significative de la force musculaire (environ 8 %) et provoqué très peu d'effets secondaires dans un essai préliminaire impliquant 10 enfants atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne. Une étude en double insu avec 25-30 garçons a débuté en août 2002 et durera 9 mois environ.

Un essai avec le **coenzyme Q10** chez des enfants régulièrement traités à la prednisone ou au deflazacort a commencé en septembre 2001, un autre est prévu avec des patients en chaise roulante.

L'oxatomide, un antihistaminique, est testé sur 9 mois avec 15 garçons atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne.

La **pentoxifylline** interfère dans le système immunitaire et diminue par là l'inflammation et la fibrose. Un essai a débuté en février 2003, il durera 15 mois.

Un essai destiné à durer 15 mois a débuté en janvier 2003 pour comparer les effets positifs et négatifs de la **prednisone** administrée soit chaque jour, soit un jour sur deux, avec une dose plus forte chaque semaine.

Un essai de 6 mois avec 54 garçons atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne s'est terminé en mars 2003. Effectué en double insu, il testait soit la **créatine** soit la **glutamine**. Ses résultats sont en cours d'évaluation.

Des essais avec trois autres substances, la **taurine**, la **carnitine** et l'**acide nicotinique**, sont en préparation.

Pour l'évaluation et la documentation de ces études, des procédures de contrôle standardisées ont été développées. On ne mesure pas seulement les fonctions musculaires, mais aussi d'autres paramètres ainsi que, par exemple, la qualité de vie. Certaines méthodes sont présentement modifiées de façon à être utilisables chez des patients très jeunes et âgés (*Escolar*, Washington).

Quand y aura-t-il un traitement?

La dystrophie musculaire de Duchenne a toujours existé chez l'homme ainsi que chez les animaux qui ont des muscles squelettiques. Elle a été correctement décrite pour la première fois en 1851 par un médecin anglais, *Edward Meryon*. Elle doit toutefois son nom à un médecin français, *Duchenne de Boulogne*, qui en a décrit en 1861 non seulement les symptômes, mais aussi l'histologie.

Au vu de son mode de transmission, on a su dès le début du 20^{ème} siècle qu'un défaut situé sur le chromosome X est responsable de la maladie. Toutefois, ce n'est qu'en 1986 que le gène lui-même, le *gène de la dystrophine*, a été identifié (*Kunkel*, Boston) et que, peu après, l'on a identifié la protéine, la *dystrophine* (*Hoffman*, Washington), qui manque chez les garçons atteints de la maladie de Duchenne. Le rythme rapide de la recherche génétique a fait naître l'espoir qu'il serait bientôt possible de remplacer ou de réparer le gène et donc de guérir la maladie.

Cet optimisme était cependant prématuré. Les premières études conduites en 1991, avec le *transfert de myoblastes*, ont montré que cette technique, qui paraissait prometteuse, était *inefficace* chez les garçons atteints de la maladie de Duchenne. Aujourd'hui, plus de 16 ans après la détection du gène, il n'y a toujours pas de traitement pour la dystrophie de Duchenne. Comme le montre le présent rapport, des travaux de recherche sont effectués avec plus de 30 méthodes différentes, appliquées à des souris et à des chiens dystrophiques et, pour certaines, déjà à des garçons atteints de la maladie de Duchenne. Cependant, ces études prennent du temps et l'autorisation d'un traitement demandera des années supplémentaires.

Néanmoins, on connaît des exemples de traitements qui parviennent rapidement jusqu'aux patients, comme *Gleevec*, le médicament qui a été approuvé en 2001 en quelques mois, sans que l'on n'examine tous les effets secondaires, après que l'on eut montré qu'il pouvait guérir près de 90% des patients souffrant d'un cancer du sang, la leucémie myéloïde chronique.

Toutes ces exigences doivent être prises en compte et un grand nombre de données additionnelles devront être réunies avant qu'il soit possible de faire des prédictions sur le temps qui sera encore nécessaire pour qu'un traitement sûr et efficace soit disponible pour les enfants souffrant de la dystrophie musculaire de Duchenne partout dans le monde. La réponse à cette question est la plus importante pour les parents et leurs enfants malades. Il faudra probablement plusieurs années avant que la dystrophie musculaire de Duchenne ne soit vaincue. C'est moins que ce que l'on espérait, et c'est là le côté négatif de ce problème difficile. Le positif, ce sont les centaines de chercheurs compétents et dévoués qui, dans de nombreux laboratoires du monde entier, travaillent pour trouver un traitement. // *est donc certain qu'il existera un traitement efficace, tôt ou tard.*

Chercheurs cités dans ce rapport

Les chercheurs sont cités par ordre alphabétique avec leurs adresses abrégées et sans leurs titres. La plupart d'entre eux sont professeurs et tous ont un doctorat en médecine ou ès sciences. De nombreuses publications originales, contenant les noms de tous les membres d'une équipe de recherche, peuvent être obtenues auprès de l'auteur du présent rapport.

Richard J. **Bartlett**, National Institutes of Health, Bethesda, MD

Laurent **Bernheim**, Hôpital Cantonal Universitaire, Genf

Serge **Braun**, Synthetic Vector Products, Transgène S.A., Straßburg

Kevin P. **Campbell**, University of Iowa College of Medicine, Iowa City, IA

Jeffrey **Chamberlain**, Dept. of Neurology, University of Washington, Seattle, WA

Paula **Clemens**, Dept. of Neurology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA

Judith C. T. **van Deutekom**, Dept. of Human Genetics, Leiden University Med. Center, Leiden

Kay **Davies**, Dept. of Genetics, University of Oxford, Oxford

Diana **Escolar**, Children's National Medical Center, Washington, DC

Gerald M. **Fenichel**, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN

Kevin M. **Flanigan**, Dept. of Neurology and Pathology, University of Utah, Salt Lake City, UT

Stanley **Froehner**, Dept. of Physiology and Biophysics, University of Washington, Seattle WA

Stuart **Hodgetts**, University of Western Australia, Crawley

Eric **Hoffman**, Children's National Medical Center, Washington, DC

Paul C. **Holland**, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal

Johnny **Huard**, Children's Hospital, University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, PA
 Robert **Kapsa**, Melbourne Neuromuscular Research Institute, Melbourne
 George **Karpati**, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal
 Stephen **Kaufman**, Dept. of Cell and Structural Biology, University of Illinois, Urbana, IL
 Tejvir S. **Khurana**, Pennsylvania Muscle Institute, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA
 Stefan **Kochanek**, Zentrum für Molekularmedizin, Universität Köln
 Louis **Kunkel**, Harvard University, Children's Hospital, Boston, MA
 Hanns **Lochmüller**, Genzentrum der Universität, München
 Jerry **Mendell**, Dept. of Neurology, Ohio State University, Columbus, OH
 Clemens **Müller-Reible**, Humangenetisches Institut, Biozentrum der Universität, Würzburg
 Francesco **Muntoni**, Dept. of Paediatrics, Imperial College School of Medicine, London
 Roel **Nusse**, Dept. of Developmental Biology, Stanford University, Stanford
 Gertjan B. **van Ommen**, Dept. of Human Genetics, Leiden University Medical Center, Leiden
 Terrence **Partridge**, Muscle Cell Biology Group, Hammersmith Hospital, London
 Thomas **Rando**, Dept. of Neurology, Stanford University School of Medicine, Palo Alto, CA
 Bernd **Reitter**, Kinderklinik der Universität, Mainz
 Michael **Rudnicki**, Ottawa Health Research Institute, Ottawa
 Urs T. **Rüegg**, Ecole de Pharmacie de l'Université, Lausanne
 Günter **Scheuerbrandt**, Testlaboratorium Breitnau, Breitnau bei Freiburg
 H. Lee **Sweeney**, Dept. of Physiology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA
 James G. **Tidball**, Dept. of Physiological Sciences, University of California, Los Angeles
 Jacques **Tremblay**, Unité de Génétique humaine, Université Laval, Québec City
 Theo **Wallimann**, Institut für Zellbiologie, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich
 Maggie C. **Walter**, Friedrich-Baur-Institut, Medizinische Klinik der Universität, München
 Dominic **Wells**, Dept. of Neuromuscular Diseases, Imperial College of Medicine, London
 Steve **Wilton**, Australian Neuromuscular Research Institute, University of Western Australia, Perth
 Jon **Wolff**, Dept. of Pediatrics, University of Wisconsin Medical School, Madison, WI

Guenter Scheuerbrandt PhD, Im Talgrund 2, D-79874 Breitnau, Germany.
Tel.: +49-7652-91813-0, Fax: +49-7652-91813-13, e-Mail: gscheuerbrandt@t-online.de

Ce rapport sera mis à jour de temps à autre en fonction des nouveaux résultats des recherches. Tous ceux qui désirent recevoir les mises à jour ainsi que la version 2004 du rapport doivent envoyer leur adresse électronique à Dr. Scheuerbrandt.

Ce rapport est visible sur internet à l'adresse <http://www.duchenne-research.com>, également en allemand, français, espagnol et italien.

Un exemple d'omission d'exon

On explique ici, au niveau des molécules, le détail de l'omission de l'exon 46 par laquelle la dystrophie musculaire de Duchenne, provoquée par la délétion de l'exon 45, est transformée en dystrophie musculaire de Becker.

Une partie de la séquence de base des exons 45 et 46 de l'ARNm du gène de la dystrophine est montrée, ainsi que la fin de l'exon 44 et le début de l'exon 47. Dans l'exon 45, 50 triplets ne sont pas montrés et 30 dans l'exon 46. Sous chaque triplet (codon), est indiqué le nom de l'acide aminé par son abréviation selon le code génétique. Les triplets se suivent les uns les autres sans espace, les tirets ne sont là que pour mettre en évidence le cadre de lecture et les lignes verticales que pour indiquer les limites des exons. L'oligoribonucléotide "thérapeutique", qui provoque l'omission d'exon, se lie aux 19 bases soulignées de l'exon 46 du pré-ARNm. Les trois bases du signal stop caché sont aussi soulignées. L'exon 45 se termine après la deuxième base du dernier triplet, lequel est complété par la première base de l'exon 46 (-AGG-AG | G-CUA-) pour donner AGG.

Fin Exon 44	Début Exon 45	Fin Exon 45	Début Exon 46
-UGG-UAU-CUU-AAG	GAA-CUC-CAG-GAU---	AGA-AAA-AAG-AG	G-CUA-GAA-GAA-
trp tyr leu lys	glu leu gln asp	arg lys lys arg	leu glu glu

stop code caché

oligoribonucléotide antisens

GUC-GUU-GAU-UUU-UUU-UUC-G

Fin Exon 46 |

--AAU-GAA-UUU---AAA-GAG-CAG-CAA-CUA-AAA-GAA-AAG-CUU-GAG-CAA-GUC-AAG |

asn glu phe lys glu gln gln leu lys glu lys leu glu gln val lys |

| **Début Exon 47**

| UUA-CUG-GUG-GAA-GAG-UUG---

| leu leu val glu glu leu

Si seul l'exon 45 manque dans l'ARNm, le cadre de lecture dans l'exon 46 est déplacé d'un nucléotide vers la gauche, l'exon 46 commence alors

au lieu de | G-CUA-GAA-GAA-C par | GCU-AGA-AGA-ACA

| leu glu glu | ala arg arg thr

avec pour conséquence que 16 acides aminés incorrects sont incorporés dans la dystrophine jusqu'à ce qu'enfin un signal stop prématuré UGA soit atteint, lequel était précédemment caché (-AAU-GAA-UUU- est changé en -AAA-UGA-AUU-, le triplet UGA est souligné ci-dessus). La synthèse de la protéine est interrompue prématurément, la dystrophine est incomplète, et la *dystrophie musculaire de Duchenne* se développe. Après la délétion de l'exon 45, l'exon 44 est suivi directement de l'exon 46:

Fin Exon 44 | **Début Exon 46**

-UGG-UAU-CUU-AAG | GCU-AGA-AGA-ACA---AGA-UUU-AAA-UGA-AUU-UGU-UUU

AUG-

trp tyr leu lys | ala arg arg thr arg phe lys **STOP!**

Si, en plus de l'exon 45 manquant, on retire aussi l'exon 46, on ne perturbe pas le cadre de lecture, il n'y a pas de signal stop prématuré, mais il manque 108 acides aminés dans la partie centrale de la dystrophine, laquelle est toutefois encore partiellement fonctionnelle. Ceci transforme la grave dystrophie musculaire de Duchenne en la dystrophie musculaire de Becker bien moins grave.

Fin Exon 44 | **Début Exon 47**

---UAC-AAA-UGG-UAU-CUU-AAG | UUA-CUG-GUG-GAA-GAG-UUG---

tyr lys trp tyr leu lys | leu leu val glu glu leu
