



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>
Eprints ID : 16504

To cite this version :

Scholl, Valérie. *Avancées dans la compréhension des myopathies de Duchenne et de Becker et de leur traitement à l'aide des modèles animaux*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 126 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

AVANCÉES DANS LA COMPRÉHENSION DES MYOPATHIES DE DUCHENNE ET DE BECKER ET DE LEUR TRAITEMENT À L'AIDE DES MODÈLES ANIMAUX

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

SCHOLL Valérie

Née, le 27/10/1991 à Böblingen (Allemagne)

Directeur de thèse : Mme Christelle CAMUS

JURY

PRESIDENT :
Mme Bettina COUDERC

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
Mme Christelle CAMUS
Mme Véronique GAYRARD

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département.

Mise à jour : 06/09/2016

DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN

ELEVAGE ET PRODUITS/SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRINAIRE	SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES	SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS
<p>Responsable : M. SANS</p> <p>ALIMENTATION ANIMALE : M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p>ÉPIDÉMIOLOGIE : Mathilde PAUL, MC</p> <p>MALADIES RÉGLEMENTÉES-ZOONOSES-MÉDECINE PREVENTIVE DES CARNIVORES DOMESTIQUES-DROIT VÉTÉRINAIRE : M. PICAUVET Dominique, PR</p> <p>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE : M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHSIRA Emilie, MC</p> <p>HYGIÈNE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS : M. BRUGÈRE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laura, MCC</p> <p>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION : M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p>PATHOLOGIE DES RUMINANTS : M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIÈRE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, MC M. MEYER Gilles, PR</p> <p>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVIAIRE ET PORCINE : Mme WARET-SZKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p>PRODUCTIONS ANIMALES AMÉLIORATION GÉNÉTIQUE ÉCONOMIE : M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p>	<p>Responsable : Mme GAYRARD</p> <p>ANATOMIE : M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNEREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC</p> <p>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE : M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, MC Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR</p> <p>BIOLOGIE MOLECULAIRE : Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, MC</p> <p>MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES : M. MILON Alain, PR M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, MC Mme DANIELS Hélène, MC</p> <p>BIOSTATISTIQUES : M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p>PHARMACIE-TOXICOLOGIE : M. PETIT Claude, PR Mme CLAUW Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p>PHYSIOLOGIE - PHARMACOLOGIE THÉRAPEUTIQUE : M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p>BIOCHIMIE : Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p>ANGLAIS : M. SEVERAC Benoît, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p>	<p>Responsable : Mme CADIERGUES</p> <p>ANESTHÉSIOLOGIE M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p>CHIRURGIE : M. AUTEFAGE André, PR M. ASIMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p>MÉDECINE INTERNE : Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC</p> <p>OPHTALMOLOGIE : M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p>DERMATOLOGIE : Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p>IMAGERIE MÉDICALE M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p>BIOLOGIE MOLECULAIRE : Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p>PATHOLOGIE DES ÉQUIDES : M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme PRADIER Sophie, MC Mme LALLEMAND Elodie, AERC</p>

Remerciements

A Madame le Professeur Bettina COUDERC

Professeur à l'Institut Universitaire du Cancer Toulouse – Oncopole,
Université Paul Sabatier TOULOUSE
Biologie moléculaire et Biotechnologie,
Qui m'a fait l'honneur d'accepter la Présidence de ce jury de thèse,
Pour l'intérêt porté à notre travail,
Mes hommages respectueux.

A Madame le Professeur Christelle CAMUS

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Biologie et Génétique Moléculaires,
Pour m'avoir encadrée dans ce travail,
Pour son aide et ses conseils tout au long de sa réalisation,
Qu'elle trouve ici l'expression de mes plus sincères remerciements.

A Madame le Professeur Véronique GAYRARD-TROY

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Physiologie de la reproduction, Endocrinologie
Qui m'a fait l'honneur de participer à mon jury de thèse et d'avoir
accepté de juger ce travail,
Toute ma gratitude.

Introduction	14
Première partie : Compréhension de la maladie de Duchenne et de Becker au travers des modèles animaux.....	16
I. L'absence de la protéine dystrophine fonctionnelle et entière, responsable de la maladie de Duchenne	16
A. La protéine dystrophine	16
B. Le gène de la dystrophine et ses mutations.....	19
C. Le modèle souris mdx déficient en dystrophine	21
D. Des modèles primates déficients en dystrophine	21
E. Les modèles canins cDMD déficients en dystrophine.....	21
F. Les modèles rats déficients en dystrophine	23
G. La dystrophine chez les modèles chats	24
H. La dystrophine chez les modèles porcs.....	25
I. La dystrophine chez les modèles non-mammifères : drosophile, poisson-zèbre et <i>Ceanorhabditis elegans</i>	26
1. Le modèle Zebrafish, <i>Danio rerio</i>	26
2. Modèle Drosophile, <i>Drosophila melanogaster</i>	28
3. Modèle <i>Ceanorhabditis elegans</i>	29
II. Protéines associées à la dystrophine via le DGC, dont le rôle est précisé à l'aide des modèles animaux.....	30
A. D'autres protéines jouent un rôle similaire à la dystrophine.....	30
B. Rôles joués par l'Utrophine et l'Intégrine	31
C. Rôle joué par l'interaction dystroglycane/sarcoglycane-dystrophine	32
D. Interaction dystrobrevine/syntrophine-dystrophine.....	33
III. Physiopathologie comparée de la myopathie de Duchenne et de Becker	34
A. Les manifestations cliniques chez l'homme	34
B. Les manifestations cliniques chez le modèle souris mdx.....	37
C. Evolution du modèle souris pour approcher au mieux la clinique de l'homme	39
D. Les manifestations cliniques chez les modèles canins, cDMD	41
E. Manifestations cliniques chez le modèle rat.....	48
F. Manifestations cliniques chez le modèle chat	49
G. Manifestations cliniques chez le modèle porcin	50
H. Manifestations cliniques chez les non-mammifères	54
1. Modèle poisson-zèbre, <i>Danio rerio</i>	54
2. Modèle drosophile, <i>Drosophila melanogaster</i>	56

3.	Modèle <i>Ceanorhabditis elegans</i>	59
IV.	D'autres organes atteints lors de myopathie de Duchenne et de Becker	62
A.	L'atteinte cardiaque	62
B.	L'atteinte du système nerveux central et périphérique.....	65
C.	Atteinte des muscles lisses.....	67
1.	Les vaisseaux	67
2.	Le tube digestif	68
D.	Atteinte diaphragmatique.....	68
	Deuxième partie : Thérapie génique pour traiter la maladie de Duchenne et de Becker à l'aide des différents modèles animaux	71
I.	Les principes de la thérapie génique.....	71
A.	Actualités sur la thérapie génique dans le cadre de la myopathie de Duchenne et de Becker	71
1.	Objectifs de la thérapie génique	71
2.	Principes du remplacement du gène de la dystrophine muté	72
3.	Principes de réparation du gène de la dystrophine muté.....	73
B.	Comment le gène de la dystrophine fonctionne-t-il ?	74
1.	Petites isoformes naturelles de la dystrophine.....	74
2.	Quelle est l'importance des différents domaines de la dystrophine ?	75
3.	Mini et micro-gènes synthétiques pour une protéine dystrophine plus courte ...	76
C.	Détermination du niveau d'expression du gène nécessaire pour un effet thérapeutique...	79
D.	Traiter les précurseurs des cellules musculaires ?	80
E.	Les réponses immunitaires cellulaires et humorales, un défi important.....	81
II.	Le remplacement du gène défectueux de la dystrophine.....	82
A.	Les fibres musculaires révertantes.....	82
B.	Remplacement du gène défectueux par la séquence entière codant pour la dystrophine..	83
C.	Remplacement du gène défectueux de la dystrophine par de petits gènes artificiels	84
D.	Traiter tous les muscles de l'organisme	85
III.	La réparation du gène défectueux de la dystrophine	86
A.	Les principes de la réparation du gène de la dystrophine	86
B.	La réparation de l'ARNm transcrit du gène défectueux de la dystrophine.....	87
1.	Le saut d'exons	87
2.	L'Ataluren, une translecture de codons stop prématurés	91
C.	La réparation du gène défectueux de la dystrophine directement sur l'ADN	92
IV.	La thérapie génique indépendante du gène de la dystrophine	94
A.	Utilisation du gène de l'utrophine et de l'intégrine.....	94

B.	Utilisation du gène SERCA (Sarco/endoplasmique reticulum calcium ATPase)	95
C.	Utilisation du gène Galgt2	95
V.	La thérapie génique chez l'homme suite aux résultats obtenus sur les modèles animaux	96
	Troisième partie : Les autres thérapies développées grâce aux modèles animaux .	98
I.	Des thérapies qui s'attaquent aux conséquences cliniques des myopathies de Duchenne et de Becker	98
II.	Réduction de l'inflammation	100
A.	L'inflammation dans le cadre de la myopathie de Duchenne	100
B.	L'utilisation des corticostéroïdes, effet anti-inflammatoire mais pas seulement.....	101
C.	Des co-traitements aux stéroïdes, des exemples non-exhaustifs	103
1.	Utilisation d'arginine butyrate	103
2.	Utilisation de la taurine	103
3.	L'aminophylline (théophylline).....	104
4.	Des antioxydants non spécifiques	104
III.	Les antifibrotiques.....	105
A.	La fibrose lors de myopathie de Duchenne et de Becker.....	105
B.	L'Halofuginone	105
C.	La Sphingosine-1-phosphate (S1P), un lipide bioactif	106
IV.	Inhibition de la myostatine pour augmenter la force musculaire.....	106
V.	L'utilisation de cellules souches pour régénérer les fibres des muscles dystrophiques.....	107
VI.	Phases cliniques chez l'homme des thérapies pharmacologiques et cellulaires	110
	Conclusion	112
	Bibliographie	116

Liste des figures :

Figure 1 : Représentation schématique de la dystrophine et du complexe de glycoprotéines associé à la dystrophine (DGC)	17
Figure 2 : Section transverse d'une fibre musculaire.....	18
Figure 3 : Les mutations du gène de la dystrophine	20
Figure 4 : Le type de mutations du gène DMD	20
Figure 5 : Les mutations de la dystrophine chez les différents modèles souris.....	21
Figure 6 : Les mutations de la dystrophine chez les différents modèles canins.....	22
Figure 7 : Détection par immunoblot de la dystrophine chez deux chats mâles présentant une dystrophie musculaire.....	24
Figure 8 : Détection de dystrophine par immunofluorescence chez des chats sains et dystrophiques.....	24
Figure 9 : Comparaison de la dystrophine de l'homme et du poisson-zèbre	27
Figure 10 : Mutation non-sens (AAA→TAA) chez le mutant <i>sap^{ta222a} dmd</i> dans l'exon 4.....	27
Figure 11 : La structure du gène dystrophine (Dys) de la drosophile	28
Figure 12 : Expression de la dystrophine dans l'embryon de la drosophile	29
Figure 13 : Alignement des dystrophines humaine et de <i>C. elegans</i>	29
Figure 14 : Analyse de l'expression de l'utrophine chez des porcs DMD vs. Sauvages	31
Figure 15 : Expression du sarcoglycane chez des rats sauvages et <i>Dmd^{mdx}</i>	33
Figure 16 : Alignement de la dystrobrevine humaine et celle de <i>C. elegans</i>	34
Figure 17 : Répartition des patients par phénotype clinique	35
Figure 18 : Coupe histologiques du muscle tibialis anterior chez une souris mâle <i>mdx52</i> de 6 semaines.....	38
Figure 19 : Comparaison de l'espérance de vie chez l'homme atteint de myopathie de Duchenne et chez la souris <i>mdx</i>	38
Figure 20 : Comparaison de l'espérance de vie chez la souris <i>mdx</i> et les modèles qui en découlent .	40
Figure 21 : Espérance de vie comparée des hommes et chiens sains avec ceux atteints de déficience en dystrophine	42
Figure 22 : Plantigradie caractéristique chez un chien cDMD (GRMD) de 6 mois.....	42
Figure 23 : Chien mâle cDMD (CXMDJ) de 6 mois.....	43
Figure 24 : Description des signes cliniques et pathologiques chez trois Golden retrievers cDMD aux phénotypes différents.....	45
Figure 25 : Etudes IRM chez des chiens cDMD	46
Figure 26 : Représentation des potentiels d'action de fibres musculaires individuelles (sSFEMG) sur le muscle peroneus longus.....	47
Figure 27 : Histologie du muscle tibialis anterior chez des rats <i>Dmd</i>	49
Figure 28 : La dystrophie musculaire chez le chat	50
Figure 29 : Modifications histologiques typiques chez le chat déficient en dystrophine.....	50
Figure 30 : Délétion ciblée de l'exon 52 sur le gène porcin DMD et ses conséquences sur la fonction musculaire	51
Figure 31 : Evolution des lésions des muscles squelettiques avec l'âge chez des porcs DMD	52
Figure 32 : Quantification de la biréfringence des muscles de poissons-zèbres mutés	54
Figure 33 : Organisation de la musculature axiale chez une larve de poisson-zèbre	55
Figure 34 : Observation des muscles squelettiques chez des mutants <i>Dmd</i> du poisson-zèbre	55
Figure 35 : Vascularisation d'une aile de drosophile	56
Figure 36 : Phénotypes d'ailes de drosophile obtenus par différentes mutations du gène homologue de la dystrophine.....	57

Figure 37 : Evolution de la dégénérescence musculaire avec l'âge chez des mutants Dmd de la drosophile (Dys) de 3, 12 et 20 jours	59
Figure 38 : Coloration à la phalloïdine des filaments d'actine chez un individu <i>C. elegans</i> sain (en haut, wild type) et chez un double mutant dys-1/hlh-1 (en bas).....	60
Figure 39 : Visualisation des muscles de la paroi du corps de <i>C. elegans</i>	61
Figure 40 : Dégradation des noyaux des cellules musculaires chez les vers déficients en dystrophine.....	61
Figure 41 : La région centrale du corps de <i>C. elegans</i> adulte de 2 jours double mutant dys-1/hlh-1, observée au microscope à contraste interférentiel (Nomarski picture).....	62
Figure 42 : Coloration au trichrome de Masson de cœurs de rats sains et mutés Dmd (F0) de 13 semaines d'âge.....	63
Figure 43 : Histologie du ventricule cardiaque gauche d'un porc dmd	63
Figure 44 : Echographies cardiaques chez des chiens cDMD.....	65
Figure 45 : Rôle du complexe dystrophine-dystroglycane dans le cerveau de la drosophile et impact du manque de dystrophine	67
Figure 46 : Coloration au trichrome de Masson de diaphragmes chez des rats Dmd (FO#8) de 13 semaines d'âge et de contrôles sains (WT) du même âge	69
Figure 47 : Pourcentage de fibres de type I dans les différents muscles chez des porcs Dmd malades et chez des contrôles sains.....	69
Figure 48 : Thérapie génique en cas de myopathie de Duchenne ou de Becker.....	71
Figure 49 : Les différents isoformes naturels de la dystrophine.....	74
Figure 50 : Isoforme Dp260 de la dystrophine.....	76
Figure 51 : Synthèse artificielle de deux nouveaux mini-gènes.....	77
Figure 52 : Synthèse artificielle de micro-gènes de moins de 4kb.....	77
Figure 53 : Dystrophine, mini-dystrophine, micro-dystrophine et le complexe de protéines DGC	79
Figure 54 : Le virus associé aux adénovirus (AAV) et ses interactions avec l'hôte	81
Figure 55 : Détermination d'un seuil d'efficacité de saut d'exon pour améliorer le phénotype de la maladie chez le poisson-zèbre Dmd.....	88
Figure 56 : Saut des exons 46 à 54 permettant de restaurer une dystrophine, raccourcie, mais fonctionnelle	90
Figure 57 : La correction de gènes par les nucléases.....	93
Figure 58 : La correction d'un gène à l'aide de la technique CRISPR/Cas9.....	94
Figure 59 : Schéma de la recherche de molécules pharmacologiques ('drug screening') pour la myopathie de Duchenne et de Becker à l'aide du modèle poisson-zèbre Dmd.....	99
Figure 60 : Inflammation chez des poissons-zèbre déficients en dystrophine	100
Figure 61 : Effet de la prednisone sur les muscles de <i>C. elegans</i>	102
Figure 62 : Coupes de muscles de poissons-zèbre homozygotes Dmd ^{ta222a/ta222a} à 28 jours post-fécondation	105
Figure 63 : Modèle de transplantation autologue de myoblastes chez des chiens normaux	108

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Mutations du gène DMD chez les chiens dystrophiques	22
Tableau 2 : Corrélation entre la quantité résiduelle de dystrophine et le phénotype clinique	36
Tableau 3 : Comparaison des caractéristiques pathologiques et fonctionnelles entre les patients et les modèles animaux de la myopathie de Duchenne	37
Tableau 4 : Comparaison de la sévérité de l'atteinte lors de myopathie de Duchenne.....	39
Tableau 5 : Comparaison des atteintes cliniques et histopathologiques du chien cDMD et de l'homme atteint de myopathie de Duchenne	41
Tableau 6 : Grades des lésions pour les muscles dystrophiques du chien cDMD colorés à l'hématoxyline, éosine et trichrome gomori modifié	44
Tableau 7 : Les différentes stratégies de thérapies géniques existantes chez la souris mdx, le chien cDMD et chez l'homme actuellement.....	73
Tableau 8 : Les différentes isoformes de la dystrophine	75
Tableau 9 : Récepteurs/corécepteurs et préférences tissulaires de l'AAV.....	85
Tableau 10 : Essais cliniques chez l'homme pour la thérapie génique dans le cadre des myopathies de Duchenne et de Becker	97
Tableau 11 : Molécules candidates qui pourraient avoir un effet bénéfique sur l'absence de dystrophine	99
Tableau 12 : Etudes précliniques de thérapies cellulaires chez le chien cDMD	107
Tableau 13 : Essais cliniques des thérapies pharmacologiques et cellulaires chez les patients DMD	110

Liste des abréviations :

2OMeAO : 2-O-methyl phosphorothioate AO
AA : Acides aminés
AAV : virus associés à un adénovirus
ABD : (Actin Binding Domain) domaine de liaison à l'actine
ADNc : ADN complémentaire
AMM : autorisation de mise sur le marché
AMPc /GMPc : adénosine monophosphate cyclique/ guanosine monophosphate cyclique
AONs : oligonucléotides antisens
ARNm : acide ribonucléique messenger
BMD : Becker Muscular Dystrophy
BMSC : (bone marrow stem cell) cellules souches de la moelle osseuse
cDMD : Dystrophie musculaire de Duchenne canine
CK : Créatine kinase
CMAH : cytidine monophosphate-sialic acid hydroxylase
CRDs : (complex repetitive discharges) décharges complexes et répétées
CRISPR/Cas : clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated nuclease/helicase
Ct : extrémité C-terminale
DGC : complexe de glycoprotéines associées à la dystrophine
Dbr : Dystrobrevine
Dg : Dystroglycane
dKO : (double knock-out) doublement muté
DLPs : Produits dystrophine like
DMD (=dmd) : Duchenne muscular dystrophy
Domaine CR : riche en cystéines
Dpf : (days post-fécondation) jours après fécondation
Dys : Dystrophine
ECG : Electrocardiogramme
EMG : Electromyographie
H&E : Hémalun et éosine
H1-H4 : régions charnières
hASCs : cellules stromales humaines dérivées des cellules adipeuses
HFMD : Feline Hypertrophy Muscular Dystrophy
IECA : inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
IGF : facteur de croissance insuline-like
IL : interleukine
MEC : Matrice extracellulaire
MSCs : cellules mésenchymateuses du stroma du cordon ombilical
mTR : ARN Télomérase
MUPs : Motor unit potentials
nNOS : nitric oxyde synthase neuronale
NO : oxyde nitrique
Nt : extrémité N-terminale
PDE : phosphodiesterase
PMO : phosphorodiamidate morpholino oligomer
S1P : sphingosine-1-phosphate

SERCA : Sarco/endoplasmique reticulum calcium ATPase
SFEMG : Single-fibre EMG
snRNA : (small nuclear ribonucleic acid) petits ARN nucléaires
SYN : Syntrophine
TALEN : transcription activator-like effector nuclease
THI : 2-acetyl-4(5)-tetrahydroxybutyl imidazole
TNF : facteur de nécrose tumorale
WT : (Wild type) type sauvage

Introduction

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique provoquant une dégénérescence progressive de l'ensemble des muscles de l'organisme. Il s'agit de la dystrophie musculaire la plus répandue chez l'homme, avec une incidence au niveau mondial allant de un sur 5000 garçons nés, à un sur 3500. 99,9% des malades sont des garçons [1].

L'incidence de la dystrophie musculaire de Becker (BMD), une forme clinique moins grave, est d'environ un tiers celle de la myopathie de Duchenne [2]. Son incidence est d'un garçon atteint sur 20 000 au niveau mondial [3].

Le gène DMD responsable de la maladie de Duchenne ou de Becker est situé sur le chromosome X et en cas de myopathie il se trouve tronqué ou délété. Ceci entraîne la présence d'une protéine dystrophine tronquée ou son absence, la dystrophine étant une protéine musculaire impliquée dans le soutien de la fibre musculaire, qui relie le cytosquelette à la matrice extracellulaire [1]. Dans un tiers des cas, la mutation responsable de la maladie survient spontanément, sans que la mère l'ait transmise.

Il existe deux types de modèles animaux pour étudier la physiopathologie de la déficience en dystrophine et le développement de thérapies : ceux qui présentent naturellement la mutation, responsable de l'absence de dystrophine, et ceux dont la mutation est générée en laboratoire. De nombreux modèles animaux pour la myopathie de Duchenne ont été développés au cours des trente dernières années, allant d'invertébrés à de grands mammifères, même si le modèle animal le plus utilisé est le modèle souris mdx, découvert il y a plus de 30 ans. En effet, les modèles animaux s'avèrent nécessaires afin d'élucider la pathogenèse, ainsi que pour évaluer l'efficacité et la toxicité lors de développement de nouvelles thérapies.

Il est à noter qu'actuellement le traitement standard de la myopathie de Duchenne et de Becker repose sur l'utilisation de stéroïdes, d'un support palliatif, ainsi qu'un traitement symptomatique. Les potentiels traitements contre la myopathie de Duchenne et de Becker peuvent être en gros classés dans trois catégories, moléculaires, cellulaires ou pharmacologiques. Les deux approches moléculaires les plus communes sont (i) la thérapie génique, lors de laquelle le gène de la dystrophine est introduit dans le muscle soit localement soit en intravasculaire, généralement en utilisant des plasmides ou des vecteurs viraux, et (ii) la correction du gène, qui implique l'introduction d'oligonucléotides pour induire soit des mécanismes de réparation, soit des sauts d'exons pour rétablir la séquence de nucléotides correcte (cadre de lecture correct). Lors de thérapies cellulaires, des cellules normales telles que des myoblastes ou des cellules souches sont transplantées dans les muscles malades. Et l'approche pharmacologique cible les mécanismes pathogéniques spécifiques qui contribuent au phénotype dystrophique. Par exemple, il existe des molécules qui réduisent l'inflammation, qui accroissent la masse musculaire, qui induisent une translecture de codons stop dans le gène déficient de la dystrophine, ou qui induisent une augmentation de la production d'utrophine, un homologue autosomique de la dystrophine. Cependant pour l'instant aucun traitement curatif n'existe. Nous donnerons des exemples de molécules en cours d'étude sans être exhaustifs.

Dans une première partie, nous présenterons comment l'étude des modèles animaux a permis de mieux comprendre le rôle de la protéine dystrophine, des protéines qui s'y associent et donc la physiopathologie qu'entraîne le manque ou l'absence de dystrophine en cas de myopathie de Duchenne et de Becker. Puis, dans une seconde partie, nous verrons les thérapies géniques à disposition et en cours de développement, à l'aide des modèles animaux, pour traiter les malades DMD. Pour terminer, dans une troisième partie, nous étudierons les thérapies pharmacologiques et cellulaires qui visent les conséquences cliniques des myopathies de Duchenne et de Becker, et dont le développement a grandement été facilité par l'étude des modèles animaux.

Première partie : Compréhension de la maladie de Duchenne et de Becker au travers des modèles animaux

- I. L'absence de la protéine dystrophine fonctionnelle et entière, responsable de la maladie de Duchenne
 - A. La protéine dystrophine

La protéine dystrophine est une protéine intracellulaire. C'est une grosse protéine cytosolique, qui se localise juste sous le sarcolemme et qui se lie aux filaments de l'actine par son extrémité Amino terminale (Nt) et aux protéines du complexe dystrophine-glycoprotéines (DGC) par son extrémité Carboxy terminale (Ct). La dystrophine est composée de 3 685 acides aminés. Des formes plus courtes de la protéine sont générées par transcription à partir de promoteurs internes. L'analyse de la structure primaire de la dystrophine permet de distinguer quatre domaines structuraux distincts (*figure 1*) : le domaine N-terminal (Nt) [AA 14-240], le grand "rod domain" central de type triple hélice "spectrine-like" [AA 253-3040] composé de 24 unités répétées, le domaine riche en cystéine (CR) [AA 3080-3360] et le domaine C-terminal (Ct) [AA 3361-3685] [4]. Un second domaine de liaison à l'actine a été identifié dans la région centrale entre les répétitions de type spectrine 11 à 17. Par ailleurs les régions charnières flexibles (H1-H4) sont des séquences riches en Prolines et interrompent le "rod domain". Les domaines de la région C-terminale qui participent à la liaison au complexe DGC sont le domaine WW, qui contient deux acides aminés tryptophane (W) conservés et favorise l'interaction entre protéines, le domaine ZZ, possédant deux doigts zinc, localisé dans la région riche en cystéines (CR), le domaine "coiled-coil" et le domaine C-terminal (Ct).

La protéine dystrophine se lie à plusieurs protéines transmembranaires (dystroglycane, sarcoglycane, sarcospane) et cytosoliques (syntrophine, dystrobrevine et nitric oxide synthase (NOS)) pour former un complexe de glycoprotéines associé à la dystrophine, DGC [5]. Ce sont les 15 derniers acides aminés C-terminaux du dystroglycane qui constituent un site de liaison unique pour la seconde moitié de la charnière 4 (H4) et le domaine riche en cystéines (CR) de la dystrophine [AA 3054-3271] [6], assurant davantage de stabilité à la dystrophine et un lieu d'ancrage supplémentaire à la matrice extracellulaire. L'extrémité carboxy-terminale de la dystrophine interagit avec les syntrophines [7] et la dystrobrevine. Nous préciserons leurs rôles par la suite.

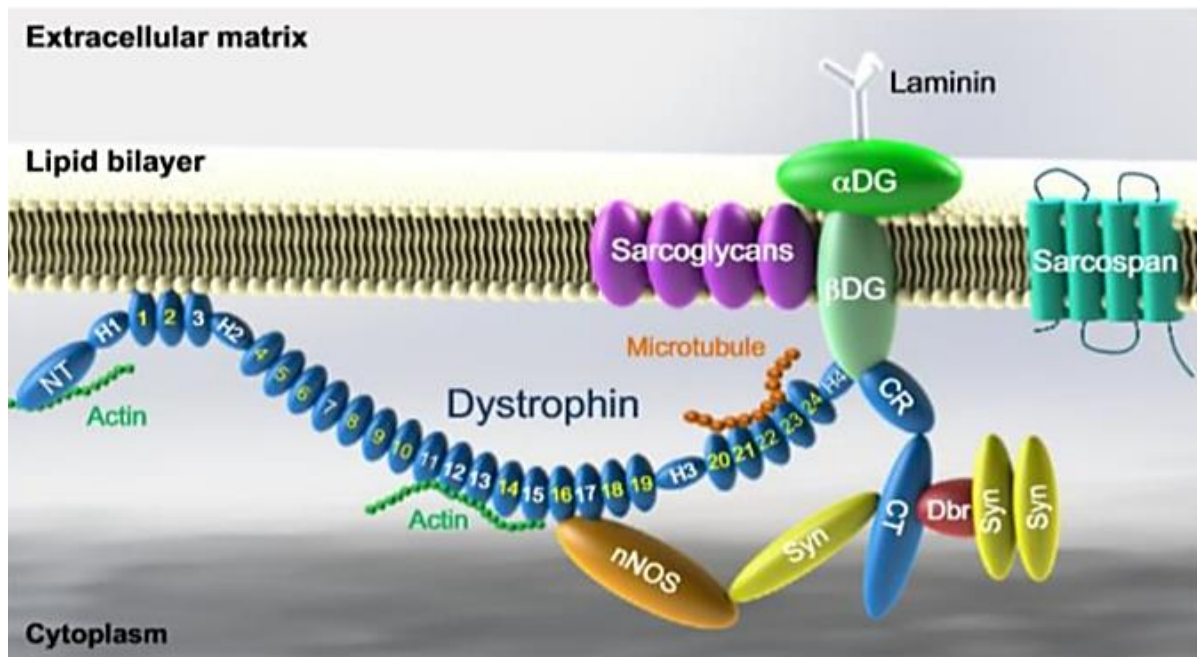


Figure 1 : Représentation schématique de la dystrophine et du complexe de glycoprotéines associé à la dystrophine (DGC).

La dystrophine contient un domaine N-terminal (Nt), un "rod domain" central riche en cystéines (CR) et un domaine C-terminal (Ct). Le "rod domain" central est composé de 24 unités spectrine-like répétées (chiffres en blancs représentent les unités chargées positivement) et de quatre charnières (H1, H2, H3 et H4). La dystrophine contient deux domaines de liaison à l'actine situés au domaine Nt et au niveau des unités 11-15. Les unités 1-3 interagissent avec la couche lipidique chargée négativement. Les unités 16 et 17 forment le domaine de liaison à la nitric oxide synthase neuronale (nNOS), dans le cas du cerveau. La dystrophine interagit avec les microtubules au travers des unités 20-23. Une partie de la charnière H4 et le domaine CR se lient à l'unité bêta du dystroglycane (bêtaDG). Le domaine Ct de la dystrophine interagit avec la syntrophine (SYN) et la dystrobrevine (Dbr). La dystrophine lie des composants du cytosquelette (actine et microtubules) à la laminine de la matrice extracellulaire. Les sarcoglycans et sarcospanes n'interagissent pas avec la dystrophine elle-même mais renforcent le (DGC), composé de la dystrophine, DG, sarcoglycans, sarcospanes, Syn, Dbr et nNOS, [1].

Une des fonctions principales de la dystrophine et du DGC est donc de renforcer le sarcolemme de la cellule musculaire en reliant la matrice extracellulaire au cytosquelette de la cellule (figure 2). De plus, le DGC constitue un transducteur mécanique, transformant les signaux physiques de la matrice extracellulaire de la cellule musculaire, en modifications dans l'expression des gènes présents dans le noyau de la cellule. En effet, la force de contraction étant communiquée de l'extérieur vers l'intérieur de la fibre musculaire, il semble évident que le DGC est impliqué dans la signalisation transmembranaire [8].

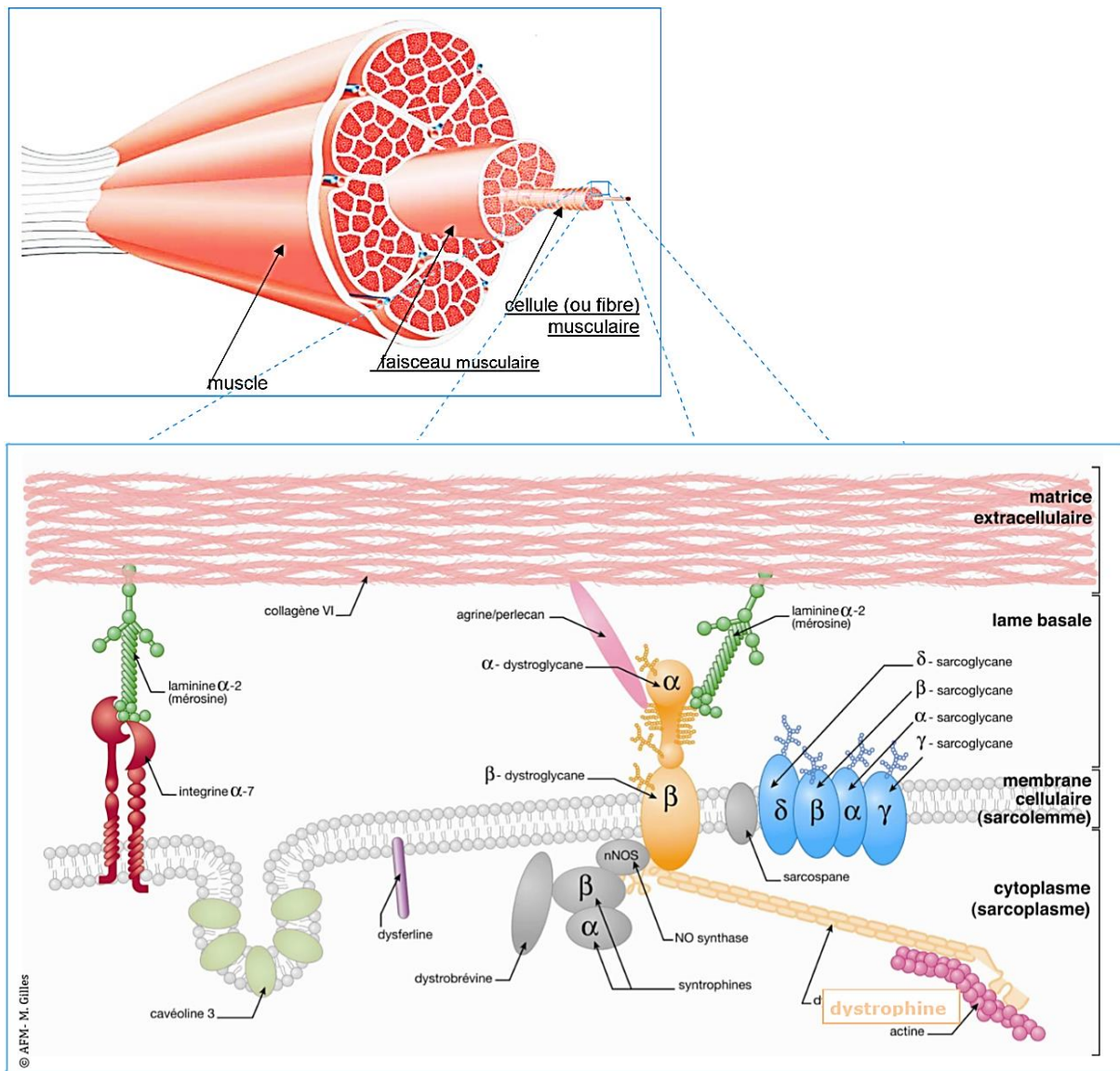


Figure 2 : Section transverse d'une fibre musculaire montrant la position approximative des plus importants composants protéiques du complexe. La dystrophine se lie à la matrice extracellulaire (MEC) aux points de contraction du sarcomère. Ce lien se forme grâce à une cascade de protéines schématiquement représentées, [9].

Les études ont montré l'importance du modèle souris mdx, déficient en dystrophine comme nous le verrons plus en détail par la suite, pour comprendre la structure et la localisation de la dystrophine [10] et pour comprendre les modifications des signaux biochimiques engendrées [11], au niveau des muscles déficients en dystrophine.

Les mécanismes provoquant la dégénérescence des fibres musculaires lors de l'absence de dystrophine (Myopathie de Duchenne) ou lors de déficit partiel et/ou de taille réduite de la dystrophine (Myopathie de Becker) ne sont pas clairement élucidés et plusieurs hypothèses ont été émises.

Afin de comprendre ces mécanismes, plusieurs modèles animaux de la myopathie de Duchenne sont étudiés. Les principaux modèles animaux sont : la souris mdx et ses dérivés, et le modèle canin cDMD et ses dérivés (le chien golden retriever GRMD, le chien Cavalier King Charles CXMD). D'autres modèles sont en cours de développement tels que le modèle porcin dystrophique ainsi que des modèles dystrophiques non mammifères tels que le ver *Caenorhabditis elegans* dystrophique, le poisson zèbre (Zebrafish) dystrophique et la drosophile dystrophique.

L'idéal et le plus représentatif serait d'effectuer les études sur l'homme même, mais éthiquement il est difficilement concevable d'effectuer de multiples biopsies musculaires sur les personnes atteintes de cette maladie, le plus souvent de jeunes garçons, pour en comprendre le fonctionnement. Des méthodes d'étude non invasives ont été testées [12], mais présentent des limites, et c'est donc au travers des différents modèles animaux que plusieurs hypothèses ont été émises.

Parmi les différents mécanismes probables [9], on retient une première hypothèse **mécanique**, qui suggère qu'un défaut de dystrophine entraîne une rupture du lien entre l'intérieur et l'extérieur de la fibre musculaire, provoquant une fragilisation de la membrane de cette cellule musculaire et sa rupture au moment des contractions musculaires. Un autre mécanisme associé serait une augmentation de l'entrée de **calcium** dans la fibre musculaire. En effet, lors des dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker, la membrane de la fibre musculaire est davantage perméable et permet notamment au calcium d'entrer. On a donc une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium, ce qui induit l'activation de protéases, qui amplifient une cascade de réactions aboutissant à la destruction de la cellule musculaire [12]. Il y aurait également un mécanisme **vasculaire**, puisque parmi les différentes protéines qui participent au complexe DCG, on retrouve l'enzyme NOS ou "NO synthase" musculaire, qui permet la synthèse du monoxyde d'azote (NO) dans les cellules musculaires. Ce monoxyde d'azote entraîne une dilatation locale des vaisseaux sanguins, ce qui améliore l'irrigation sanguine du muscle à cet endroit et augmente l'apport d'oxygène et de nutriments nécessaires au muscle lors d'un effort. Or dans les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker, le complexe DCG est déstabilisé et la NOS est délocalisée, ce qui pourrait aggraver l'ischémie du muscle et donc la fatigue musculaire. Ce même mécanisme pourrait également participer à l'inflammation du tissu musculaire observée dans la DMD. Une dernière hypothèse **inflammatoire** est retenue, car une inflammation du tissu musculaire est observée à l'examen au microscope de la biopsie musculaire de muscles atteints de myopathie DMD. Celle-ci contribuerait à la dégénérescence des fibres musculaires.

Nous verrons par la suite que les modèles animaux ont permis de préciser tous ces mécanismes.

B. Le gène de la dystrophine et ses mutations

Le gène de la dystrophine est dans un premier temps localisé en Xp21 en 1986 [13]. Puis c'est en 1987 qu'est découverte la séquence du gène codant pour la dystrophine [14]. Il s'agit du plus grand gène connu, puisqu'il correspond à environ 0,1% du génome et environ 1,5% du chromosome X [15]. En effet, il mesure 2,4-Mb et est composé de 79 exons, voire 86 exons si on inclut les sept promoteurs liés aux premiers exons. La région codant pour la protéine dystrophine, qui correspond à l'ADNc, fait donc 11,2 kb [16]. 99% du gène de la dystrophine est donc composé d'introns, ce qui est un élément intéressant dans le cadre de la thérapie génique, comme nous le verrons dans la troisième grande partie.

La maladie de Duchenne est donc liée à des mutations dans le gène DMD sur le chromosome X, ("*Frame-shift mutations*") avec un décalage du cadre de lecture, entraînant un déficit total de la protéine dystrophine. La maladie de Becker est liée à des mutations dans le gène DMD sur le chromosome X respectant le cadre de lecture, entraînant un déficit partiel en protéine dystrophine et/ou une production d'une dystrophine de taille anormale, tronquée, entraînant une dystrophie musculaire un peu moins délétère [1], (*figure 3*).

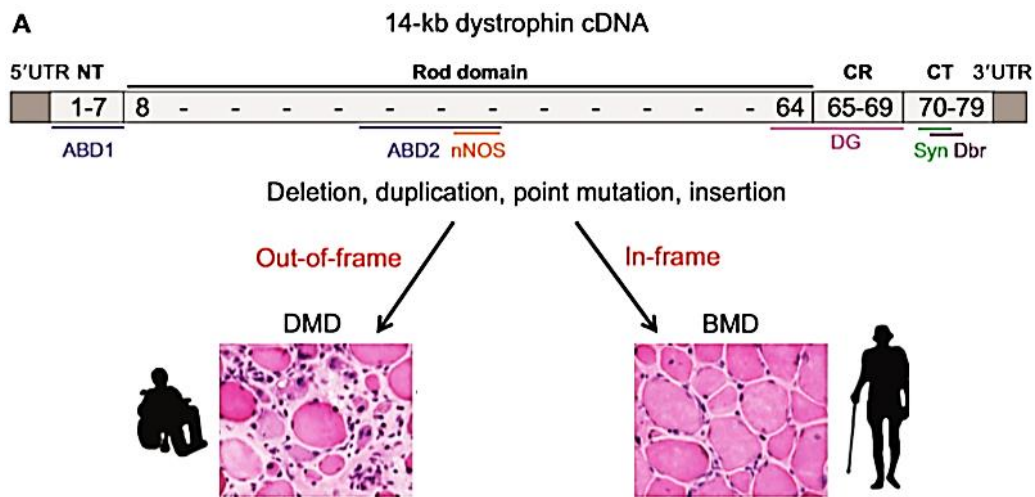


Figure 3 : Les mutations du gène de la dystrophine entraînant les myopathies de Duchenne et de Becker. ABD : actin binding domain, DG : dystroglycane, Syn : syntrophine, Dbr : dystrobrevine, [1].

Les régions les plus sensibles aux mutations sont les régions des exons 3 à 7 et des exons 45 à 55 [17]. Historiquement, environ deux tiers des mutations du gène DMD ont été de larges délétions, (figure 4). Ces délétions sont retrouvées de manière prédominante dans une des deux régions les plus sensibles aux mutations, le "rod domain" central autour des exons 44-53 (~80%) et avec une fréquence moins importante (~20%) à l'extrémité 5' [1].

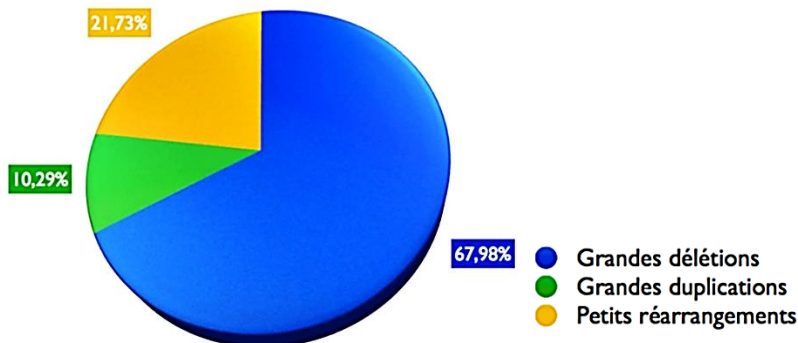


Figure 4 : Le type de mutations du gène DMD, [15].

Malheureusement il n'est pas toujours facile de différencier les mutations de Duchenne de celles de Becker, car toutes les mutations maintenant le cadre de lecture n'entraînent pas forcément une maladie de Becker et toutes celles ne maintenant pas le cadre de lecture n'entraînent pas forcément une maladie de Duchenne. En effet selon le site de la délétion, il est parfois difficile pour le laboratoire de trancher pour l'une ou l'autre myopathie.

La découverte du gène de la dystrophine a révolutionné le diagnostic de la myopathie de Duchenne et créé de l'espoir pour la mise en place de traitements basés sur la thérapie génique. En effet, avec l'arrivée de techniques comme la PCR multiplexe, les myopathies de Duchenne et de Becker peuvent être diagnostiquées de manière non invasive, sans avoir recours à la biopsie musculaire [18].

C. Le modèle souris mdx déficient en dystrophine

Le modèle de souris mdx a été le modèle le plus classiquement utilisé dans la recherche sur la maladie de Duchenne.

Une forme spontanée de dystrophie musculaire a été identifiée dans une lignée de souris C57BL/10. Elle est due à une mutation ponctuelle, qui a été identifiée au niveau de l'exon 23 du gène DMD [19]. Plus précisément, c'est une mutation non-sens, lors de laquelle une base azotée cytosine est remplacée par une thymine, créant un codon stop [20].

Les importantes différences phénotypiques observées entre les souris et les humains déficients en dystrophine comme nous le verrons dans la partie sur les manifestations cliniques, a motivé l'identification du type d'atteinte du gène de la dystrophine et sa corrélation avec les différents phénotypes de la myopathie de Duchenne observés.

De nombreux autres modèles souris avec des mutations différentes au niveau du gène DMD ont été créés artificiellement par la suite (figure 5). Ce sont des variants du modèle mdx, tels que les modèles mdx2cv, mdx3cv, mdx4cv et mdx5cv [Annexe 1]. Tous les modèles souris qui font suite au modèle initial mdx sont porteurs d'une mutation ponctuelle au niveau d'autres exons du gène DMD, pour approcher et détailler le plus possible ce qui se passe chez l'homme. En effet, ~60% des signes cliniques de la myopathie de Duchenne chez l'homme sont liés à des délétions des exons 45 à 53, ou à des duplications de l'exon 2 [21]. D'où l'étude des modèles souris mdx 52 (délétion de l'exon 52) et Dup2 (duplication de l'exon 2) qui sont porteurs de mutations ressemblant fortement aux délétions et duplications présents chez les humains atteints de myopathie de Duchenne.

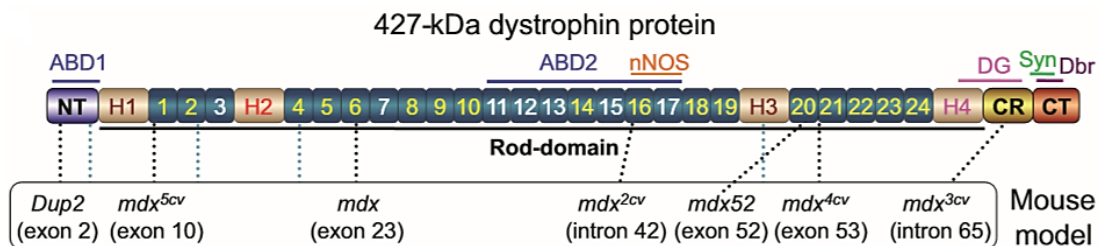


Figure 5 : Les mutations de la dystrophine chez les différents modèles souris, [1].

Ces modèles souris constituent notamment d'excellents modèles pour les tests précliniques.

D. Des modèles primates déficients en dystrophine

Il n'y a actuellement pas de réels modèles primates pour les déficiences en dystrophine. Des modèles primates déficients en dystrophine ont été utilisés pour optimiser les conditions des traitements tels que les transferts de myoblastes [22], mais ces modèles ne sont pour l'instant pas utilisés en recherche sur les myopathies de Duchenne et de Becker dans une plus large mesure.

E. Les modèles canins cDMD déficients en dystrophine

La dystrophie musculaire canine liée au chromosome X a été décrite dans la littérature depuis plus de 50 ans. C'est en 1958, que le premier cas de dystrophie musculaire canine chez un chiot Golden Retriever a été répertorié [23]. La déficience en dystrophine a été confirmée dans

environ 20 races de chiens différentes chez des mâles essentiellement [Annexe 1], ce qui confirme le lien avec le chromosome X pour la transmission de la déficience en dystrophine.

Puis, les mutations spontanées du gène de la dystrophine ont été caractérisées et étudiées dans neuf races de chiens cDMD (tableau 1). Ce sont soit des mutations ponctuelles, retrouvées par exemple chez le Cavalier King Charles Spaniel (CKCSMD, intron 50), chez le golden retriever (GRMD, intron 6) et chez le Rottweiler (exon 58), soit des délétions, retrouvées chez trois races, dont une petite délétion de 4 nucléotides au niveau de l'exon 65 (Cocker spaniel), une délétion des exons 8-29 chez le Tibetan terrier, et une délétion du gène en entier chez le German shorthaired pointer [1], (figure 6).

Tableau 1 : Mutations du gène DMD chez les chiens dystrophiques, [2].

Race	Mutation	Publication
Golden retriever	Mutation ponctuelle au niveau d'un site d'épissage, avec saut de l'exon 7 dans le transcrit	Sharp et al. (1991)
German shorthair pointer	Délétion englobant le gène entier de la dystrophine	Schatzberg et al. (1999)
Rottweiler	Mutation ponctuelle faux sens dans l'exon 58	Winand et al. (1994)
Cavalier King Charles spaniel	Mutation ponctuelle au niveau d'un site d'épissage, avec saut de l'exon 50 dans le transcrit	Walmsley et al. (2010)
Pembroke Welsh corgi	Insertion dans l'intron 13	Smith et al. (2011)
Labrador retriever	Insertion dans l'intron 19	Smith et al. (2007; publication actuelle)
Cocker spaniel	Délétion de quatre nucléotides dans l'exon 65	Publication actuelle
Tibetan terrier	Délétion des exons 8-29	Publication actuelle

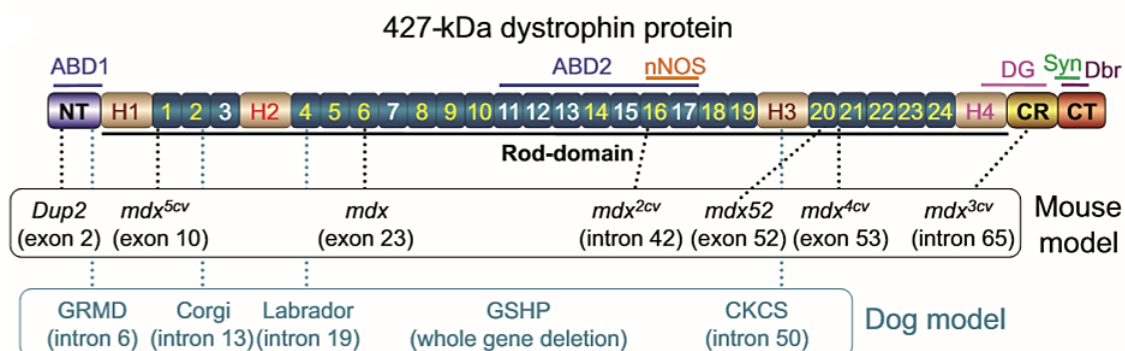


Figure 6 : Les mutations de la dystrophine chez les différents modèles canins, [1].

C'est la dystrophie musculaire chez le golden retriever (GRMD) qui a été la plus étudiée et la plus décrite dans les modèles canins pour les myopathies de Duchenne et de Becker. En effet, le chien GRMD présente une mutation ponctuelle de l'intron 6 entraînant l'exclusion de l'exon 7 au niveau de l'ARNm. Ceci entraîne l'apparition d'un codon stop prématuré et l'absence de dystrophine [24]. Le modèle golden retriever, GRMD, a été le premier décrit, et est le modèle canin cDMD le plus utilisé.

Malgré une documentation importante existant sur la déficience en dystrophine chez les chiens, la plupart des études sont limitées à des rapports de cas isolés. Des colonies expérimentales ont uniquement été mises en place pour quelques races (GRMD, beagle présentant la mutation GRMD, Welsh corgi cardigan présentant une insertion au niveau de l'intron 13, Labrador retriever présentant une insertion au niveau de l'intron 19 et le Cavalier King Charles spaniel présentant une mutation ponctuelle au niveau de l'exon 50). Le fond génétique des malades DMD étant très variable et complexe, une race de chien peut difficilement modéliser toute cette hétérogénéité. Des croisements de la race GRMD avec d'autres races mutées dans d'autres gènes (ex : myostatine) ont été effectués afin d'essayer de générer des chiens dystrophiques avec un phénotype le plus ressemblant à celui de l'homme DMD. Par ailleurs, les Golden Retrievers sont des animaux trop grands pour être traités ou élevés facilement. Les études les utilisant ont des contraintes importantes, dictées par le comité d'éthique, ainsi que des coûts élevés associés à leur entretien et leurs soins. Une lignée de Beagles déficients en dystrophine plus petits a donc été développée, (le modèle CXMD,) par croisement avec des chiens GRMD, mais qui présentent une clinique plus modérée comparée au modèle GRMD [25]. Afin d'évaluer si la taille de l'animal avait une influence sur cette atténuation du phénotype DMD, les chiens GRMD ont été croisés avec des Labradors retrievers. Ce croisement a également généré des chiens moins malades, suggérant que c'est le croisement des races qui pourrait être à l'origine d'une diminution de l'héritage de certains gènes avec un effet délétère lors de dystrophinopathie [26]. Le modèle canin Cavalier King Charles déficient en dystrophine, CKCS-MD, constitue aussi un modèle particulièrement intéressant, car la mutation qui y est présente correspond à un endroit majeur de délétion (exons 45-53), chez l'homme atteint de myopathie de Duchenne [1].

Le modèle chien cDMD, qui regroupe tous les modèles canins pour les myopathies de Duchenne et de Becker, constitue un modèle préclinique préférentiel pour les dystrophinopathies, son phénotype clinique étant plus proche de celui de l'homme que ne l'est celui du modèle souris mdx. Cependant, le modèle cDMD présente une variabilité phénotypique [27], avec une difficulté de la représenter statistiquement. Enfin, des questions éthiques et financières font qu'il est surtout utilisé lorsqu'il s'agit de tester des protocoles ou des traitements prometteurs, faisant suite aux des résultats obtenus chez le modèle souris mdx.

F. Les modèles rats déficients en dystrophine

Le modèle rat constituerait une bonne alternative aux autres modèles animaux, car le rat reste un petit modèle, mais est tout de même dix fois plus gros qu'une souris. Il pourrait ainsi mieux représenter les lésions et les anomalies fonctionnelles, observées chez les patients DMD.

Modifier de manière ciblée le génome du rat a été un défi de longue date, mais finalement deux lignées de rats mutés pour la dystrophine (Dmd mdx) ont pu être générées. En effet, les deux lignées présentent un niveau de détection de la dystrophine nul par Western blot et moins de 5% des fibres musculaires dystrophine-positives par immunohistochimie [28]. Les mutations générées sont transmissibles aux générations suivantes.

Ces modèles rats devraient prouver leur utilité pour le développement de nouvelles méthodes thérapeutiques contre la myopathie de Duchenne [29]. En effet, les rats de laboratoires, de par leur taille entre celle de la souris et celle du chien, a longtemps été considéré comme une espèce utile pour le développement de nouveaux traitements pour l'homme, particulièrement pour l'évaluation des effets pharmacologiques et toxiques. Comparé à la taille des souris, il est plus facile de réaliser les prises de sang sur des rats, ce qui permet donc des analyses plus précises. Les rats sont également utiles pour les études comportementales et pour des études cognitives, car ils sont capables d'apprendre des schémas plus complexes que la souris. Ceci peut être intéressant dans le

cadre de déficience en dystrophine, qui peut avoir un impact neurocognitif, comme nous le verrons par la suite.

Il s'agit donc à présent de savoir si ces rats déficients en dystrophine peuvent être utilisés comme des modèles animaux présentant à la fois les avantages de la souris mdx et celles du chien cDMD.

G. La dystrophine chez les modèles chats

C'est en 1985 qu'a été décrite pour la première fois une dystrophie musculaire liée à une déficience en dystrophine chez des chats domestiques [30]. Il semblerait qu'elle soit liée à une atteinte du chromosome X, puisqu'elle n'a affecté que les deux mâles de la portée de quatre chatons. Une détection de la dystrophine a été réalisée par immunoblotting (*figure 7*) et immunofluorescence (*figure 8*). Elle a montré la présence de dystrophine chez les chats contrôles, mais son absence chez les deux chatons mâles atteints [31].

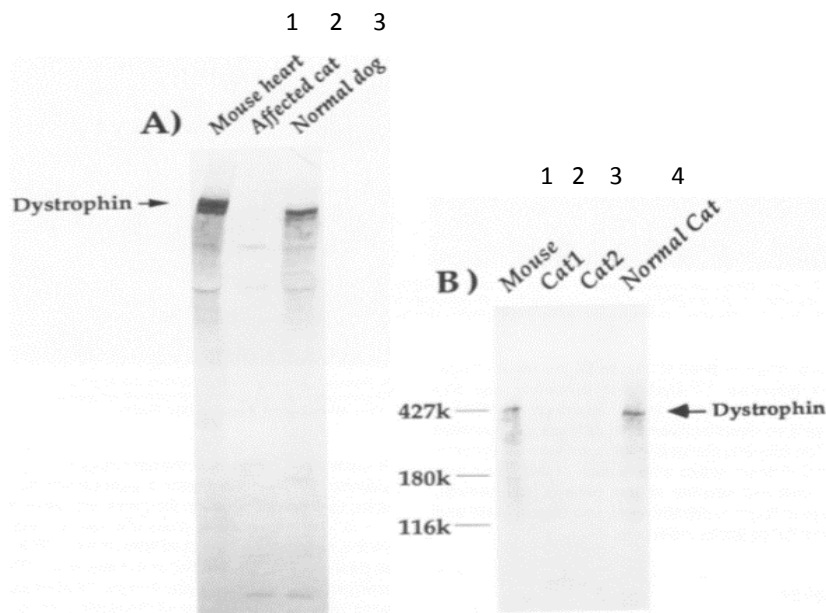


Figure 7 : Détection par immunoblot de la dystrophine chez deux chats mâles présentant une dystrophie musculaire. A: Muscle cardiaque de souris normale (puits 1), muscle squelettique de chat myopathique (puits 2), et muscle squelettique de chien normal (puits 3). B: Comparaison de détection de dystrophine dans les muscles squelettiques d'un chat normal (puits 1), des deux chats atteints de myopathie (puits 2 et 3) et dans le muscle cardiaque d'une souris normale (puits 4), [31].

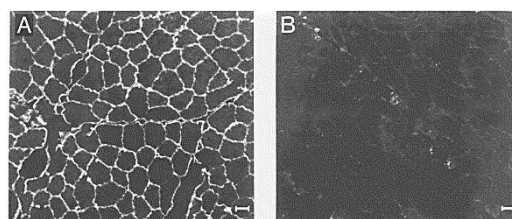


Figure 8 : Détection de dystrophine par immunofluorescence chez des chats sains et dystrophiques. A: Coupe transversale d'un muscle de chat normal. La dystrophine est mise en évidence en périphérie de chaque fibre musculaire. B: Coupe transversale d'un muscle chez un chat atteint. Absence de marquage de dystrophine. Les conditions d'expérience et le temps d'exposition de la photo étant les mêmes pour A et B. échelle=50µm, [31].

L'étude a ensuite recherché quelles modifications sur le gène de la dystrophine avaient entraîné une absence de dystrophine dans les muscles. Aucune mutation de type délétion intragénique n'a été retrouvée, tandis que c'est le type de mutation qui semble prédominer chez l'homme. Il semblerait que ces chats atteints de HFMD (Hypertrophy Feline Muscular Dystrophy) présentent une large délétion des promoteurs musculaires et dans les cellules de Purkinje à l'origine de l'incapacité à produire de la dystrophine dans les muscles squelettiques et cardiaques malgré un gène qui possède tous ses exons [32]. Cela a permis d'éclaircir quelques cas humains, où malgré un gène de la dystrophine sans délétions d'exons, on notait une absence de production de dystrophine.

Le chat constituerait un modèle d'étude intéressant, étant un peu comme le rat de taille intermédiaire entre la souris mdx et le chien CXMD. Il semble cependant n'être représentatif au niveau moléculaire que d'une petite partie des cas observés chez les patients DMD.

H. La dystrophine chez les modèles porcs

Le porc est un modèle animal souvent utilisé lors d'études sur l'homme, sa taille, son anatomie et sa physiologie ayant beaucoup de similitudes avec celles de l'homme. De plus, les porcs sont manipulables génétiquement, ce qui permet d'étudier des atteintes telles que les déficiences en dystrophine sur le plan moléculaire et de générer des modèles ayant des mutations similaires à celles de l'homme. De tels modèles porcins ont été créés par délétion de l'exon 52 du gène DMD [33], ce qui correspond à une mutation fréquemment rencontrée chez les patients DMD [34].

Par ailleurs, une lignée de porcs a été découverte, présentant une substitution spontanée dans l'exon 41 du gène de la dystrophine, entraînant le remplacement d'un acide aminé arginine par un acide aminé tryptophane (R1958W). Cette substitution entraîne des niveaux plus faibles en dystrophine dans les muscles squelettiques et cardiaques [35].

Il existe donc des modèles porcins DMD naturels et artificiels.

Chez les porcelets DMD, délétés au niveau de l'exon 52, il a été montré l'absence de dystrophine, comparé aux porcelets WT normaux, ce qui correspond à la situation de la plupart des patients atteints de myopathie de Duchenne. Chez les porcelets R1958W de 8 mois en revanche l'expression de la dystrophine n'était pas nulle, mais diminuée de 70%, dans le diaphragme, le psoas et le muscle longissimus, comparé aux porcelets sains [36]. La protéine dystrophine entière y est présente dans tous les muscles, localisée au niveau du sarcolemme, suggérant que chez ces porcelets R1958W les muscles ne sont pas déficients en dystrophine mais présentent une quantité diminuée de la protéine. Ce modèle porc R1958W présente donc des similitudes avec les patients atteints de myopathie de Becker. C'est à travers l'étude de ces mutations, notamment dans le cas du modèle R1958W, qu'il a été constaté qu'un déséquilibre d'expression entre les extrémités 5'-3' rendait l'ARNm moins stable d'où une diminution de la quantité de dystrophine générée. En effet, ce type de mutations a également été observé chez des patients atteints de myopathie de Becker [37]. Comment une substitution dans la séquence d'acides aminés modifie la sensibilité à la protéolyse est pour l'instant inconnu, même si les propriétés fortement différentes entre les acides aminés arginine et tryptophane contribuent à une structure protéique différente et à des changements conformationnels, qui diminuent la stabilité de la protéine [38]. Par ailleurs, l'altération des interactions électrostatiques au niveau du 'rod domain' déstabiliserait aussi la protéine dystrophine. Ces études à travers le modèle porc, suggèrent donc que l'insuffisance en dystrophine provient d'une instabilité de l'ARNm et potentiellement aussi d'une dégradation protéique plus élevée. La quantité diminuée de dystrophine proviendrait donc au moins en partie des dommages causés à la protéine par les contraintes générées lors des contractions musculaires.

Le modèle porcin semble prometteur dans l'étude de ce type d'atteinte, de par sa ressemblance à l'homme.

I. La dystrophine chez les modèles non-mammifères : drosophile, poisson-zèbre et *Ceanorhabditis elegans*

1. Le modèle Zebrafish, *Danio rerio*

Le poisson-zèbre, et en particulier ses embryons, sont un modèle très intéressant pour l'étude des myopathies, car ils sont constitués en grande partie de muscles squelettiques et expriment la plupart des protéines du complexe associé à la dystrophine, le DGC, avec des localisations similaires à celles chez l'homme [39]. En effet, le poisson-zèbre a notamment permis d'étudier la localisation de la dystrophine au cours du développement musculaire. Comme chez l'homme, la dystrophine est initialement exprimée aux extrémités des fibres musculaires au niveau des jonctions myo-tendineuses, puis elle migre progressivement vers d'autres sites non-jonctionnels. De plus, la majorité des gènes impliqués dans la myopathie de Duchenne sont retrouvés dans le génome du poisson-zèbre [40], ce qui permet de l'envisager comme modèle pour les études comparatives sur le plan moléculaire. Il a été montré que chez le poisson-zèbre la dystrophine intervenait comme chez l'homme dans la liaison mécanique entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette. En effet, il a été observé que les fibres musculaires se détachent au cours des contractions musculaires chez le poisson-zèbre déficient en dystrophine, ce qui suggère le rôle mécanique que joue la dystrophine entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette [41]. La dystrophine est donc nécessaire pour former un attachement stable des muscles chez les embryons du poisson-zèbre.

L'alignement de la dystrophine de l'homme (isoforme musculaire Dp427) avec celle du poisson-zèbre (*figure 9*) montre que 57% de la séquence en AA de la dystrophine du poisson-zèbre est identique à celle de l'homme, ce qui correspond à une conservation de 84% de la séquence du gène ! Par ailleurs, la structure exons-introns est fortement conservée, mis à part le premier et le dernier exon. Chaque exon du gène de la dystrophine humain possède son équivalent dans la séquence du gène de la dystrophine du poisson-zèbre, aussi appelé gène sapje. Donc la suppression de n'importe quel exon entraîne le même changement de cadre de lecture chez l'ARNm du poisson-zèbre et de l'homme.

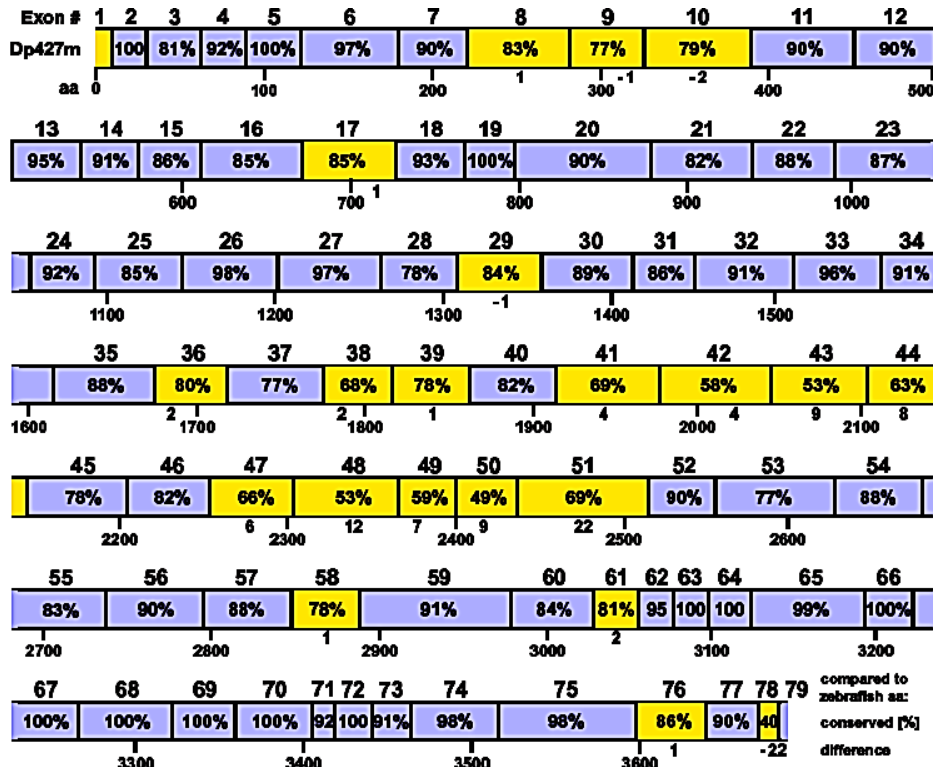


Figure 9 : Comparaison de la dystrophine de l'homme et du poisson-zèbre. Les exons de l'isoforme Dp427m de la dystrophine de l'homme sont représentés par les rectangles numérotés. En dessous est indiqué le numéro de l'acide aminé. Dans chaque rectangle est indiqué le pourcentage de conservation de chaque exon chez le poisson-zèbre par rapport à l'homme. Les rectangles bleus représentent les exons qui codent pour le même nombre d'acides aminés chez l'homme et chez le poisson-zèbre, tandis que les rectangles jaunes indiquent les exons codant pour un nombre d'acides aminés différent, qui est précisé sous chaque rectangle jaune, [42].

Le poisson-zèbre muté sapje, aussi appelé sap ou mutant dmd^{ta222a} possède une mutation non-sens dans l'exon 4 du gène sapje (sur le chromosome 1) (figure 10), à l'origine d'un codon stop, ce qui entraîne un phénotype récessif, comme les mutations sur le chromosome X chez les modèles mammifères DMD, et létal. Cette mutation est en effet à l'origine d'une protéine non fonctionnelle [43]. Chez l'homme, une mutation non-sens dans l'exon 4 du gène DMD entraîne un phénotype de type myopathie de Duchenne, ce qui suggère que chez l'homme aussi cet exon est essentiel dans le muscle [44].

A	V K E	V K* E	V * E
	G T T A A A G A A J A A T T T J T T	G T T A A A G A A J A A T T T J T T	G T T A A A G A A J A A T T T J T T
Wild type	12		
Unaffected siblings	2	5	
Affected			9

Figure 10 : Mutation non-sens (AAA→TAA) chez le mutant sap^{ta222a} dmd dans l'exon 4. Découverte d'une substitution A→T au niveau de l'exon 4 chez les mutants sapje^{ta222a}, à l'origine d'une mutation non-sens et responsable du phénotype sapje, mais uniquement chez les homozygotes, [39].

Chez les embryons homozygotes $dmd^{ta222a/ta222a}$, la protéine dystrophine est manquante à la jonction myotendineuse, ce qui entraîne un détachement du muscle [39]. Or chez l'embryon humain, il en est de même, puisque la dystrophine est d'abord exprimée aux extrémités des myofibres, adjacent aux tendons, puis avec le temps migre aux sites musculaires non jonctionnels, comme expliqué précédemment. C'est notamment cette absence de migration qui serait une des causes majeures de la pathologie chez l'homme, ce qui fait des embryons de poissons-zèbres dystrophiques de bons modèles d'étude.

Par ailleurs, d'autres mutants dmd^{pc1} , dmd^{pc2} et dmd^{tm90c} sont utilisés, dont les phénotypes sont similaires à celui du mutant dmd^{ta222a} [42]. Ils présentent tous des mutations à l'origine de codons stop prématurés. Ces mutations concernent l'exon 21 pour le mutant dmd^{pc1} , l'exon 32 pour le mutant dmd^{pc2} et l'exon 53 pour le mutant dmd^{tm90c} .

Ces modèles de poisson-zèbre sont utilisés pour le criblage de molécules à la recherche de potentiels traitements pharmacologiques contre la myopathie de Duchenne et de Becker. En effet, le poisson-zèbre constitue un excellent modèle animal pour tester de nouvelles molécules de par son élevage facile et peu onéreux. Il s'avère être un très bon modèle pour les dystrophies musculaires de l'homme, en particulier pour la myopathie de Duchenne. De plus, il est particulièrement intéressant du fait que ses embryons se développent ex-utero, sont translucides, facilement manipulables et génétiquement traçables [45], même si certes le poisson-zèbre n'est pas un mammifère et que sa dystrophie n'est pas liée à une mutation sur le chromosome X.

Cependant, le modèle poisson-zèbre présente également des limites. En effet, pour les études il faut sélectionner les poissons hétérozygotes, car les homozygotes n'atteignent pas l'âge adulte. Donc seulement 25% des embryons issus du croisement de deux hétérozygotes portent le phénotype dystrophique. Cela diminue la rentabilité, puisque les essais notamment thérapeutiques ne pourront être effectués que sur 25% de la descendance et il est aussi nécessaire de génotyper les mutants pour être sûr de la mutation qu'ils portent.

2. Modèle Drosophile, *Drosophila melanogaster*

De manière similaire au gène de la dystrophine chez les mammifères, le gène de la drosophile code pour trois produits entiers dystrophine-like, DLPs (DLP1, DLP2, DLP3), et trois produits tronqués (Dp186, Dp205, Dp117) comportant le domaine C-terminal et le domaine riche en cystéines, avec des variations dans les unités répétées spectrine-like (*figure 11*). Comme les produits issus du gène humain, les différents isoformes issus du gène de la dystrophine chez la drosophile, sont exprimés spécifiquement dans chaque tissu (*figure 12*) [46].

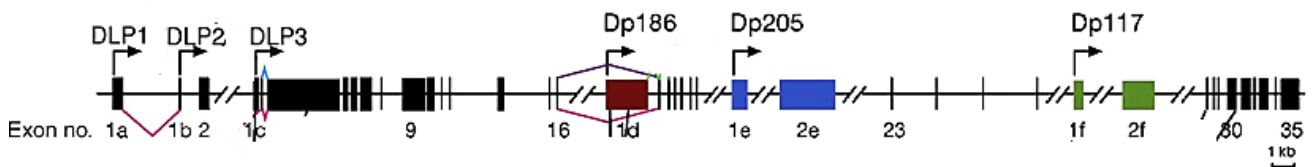


Figure 11 : La structure du gène dystrophine (Dys) de la drosophile. Les traits verticaux représentent les exons. Les traits gras horizontaux représentent les introns. Les flèches coudées représentent le début des sites de transcription, [47].

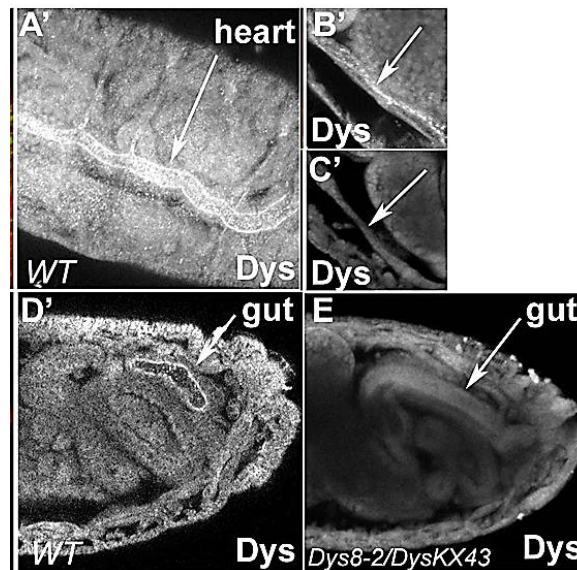


Figure 12 : Expression de la dystrophine dans l'embryon de la drosophile. La dystrophine est exprimée dans le cœur de la drosophile (A', B') et dans le système digestif (D'). Chez les mutants avec une dystrophine non fonctionnelle (*Dys⁸⁻²/DysKX43*) le marquage de la dystrophine est fortement réduit (C', E), [47].

Des études sur les capacités des mutants pour la dystrophine à s'agripper par rapport aux modèles sauvages de la drosophile suggèrent que la dystrophine est impliquée dans la musculature de la drosophile. La réduction de la quantité de dystrophine chez la drosophile entraîne une dégénérescence musculaire et une diminution de la capacité à s'agripper, âge-dépendant.

Ces mutants pour la dystrophine qui développent une dégénérescence musculaire liée à l'âge, ainsi que des difficultés locomotrices, feraient donc de très bons modèles pour la dystrophie musculaire étant en plus des organismes facilement génétiquement manipulables [47].

3. Modèle *Caenorhabditis elegans*

Le vers nématode *Caenorhabditis elegans* présente une protéine homologue à la dystrophine, appelée *dys-1*. La protéine *dys-1* possède les mêmes caractéristiques structurales que la dystrophine chez les mammifères, ce qui suggère que sa fonction physiologique a été conservée au cours de l'évolution. On note notamment une conservation des deux hélices α qui forment le domaine coiled-coil. La comparaison des séquences d'AA des dystrophines de l'homme et du nématode montre une conservation plus importante de l'hélice α 2 (52-53%) par rapport à l'hélice α 1 (25-28%) (figure 13) [48].

Dystrophins

	defg abcdefg abcdefg abcdefg abcdefg abcdefg	
hsDYS	AQIL ISLESEE RGELEIRI LADLEEE NRNLQAE YDRLKQQ	Helix 1 : Identity : 28%
ceDYS	LQII NQVEQLQ RDEMDQM LHRLOFE NKQLRKE LEWKRG	
	abcdefg abcdefg abcdefg abcdefg abcdefg abcdefg	
hsDYS	DAELIAE AKLLRQH KGRLEAR MQLEDH NKQLESQ LHRLRQL	Helix 2 Identity : 52%
ceDYS	QNDVMDE AKALRLH KORLEHR SRILEQQ NEQLEMQ LQRLKKV	

Figure 13 : Alignement des dystrophines humaine et de *C. elegans*. Deux régions qui formeraient le domaine coiled-coil. Les résidus identiques sont représentés en noir. hsDYS: dystrophine humaine; ceDYS: dystrophine *C. elegans*. Les lettres a-g désignent la position des résidus dans le domaine coiled-coil, [48].

Les mutations au niveau du gène *dys-1* n'entraînent qu'une faible perturbation des mouvements chez *C. elegans* et pas de dégénérescence musculaire dans un premier temps [49], [50]. Afin de créer un modèle nématode avec un phénotype plus proche de celui de l'homme une mutation supplémentaire a été générée en se basant sur ce qui avait déjà été réalisé chez la souris *mdx*.

En effet, le modèle souris déficient en dystrophine et en facteur myogénique MyoD, impliqué dans la détermination et la différenciation des cellules musculaires striées, montre une myopathie plus sévère que le simple modèle souris *mdx*. Le même type de double mutation a donc été testé chez le modèle *C. elegans*. En effet, l'analogue du gène codant pour le facteur myogénique MyoD chez *C. elegans* est le gène *hlh-1*, dont la délétion s'avère létale. Des vers portant la double mutation *cx18* (mutation non-sens du gène *dys-1*) et *cc561ts* (mutation faible du gène *hlh-1*) ont donc été générés. Ces doubles mutants présentent des difficultés de locomotion temps-dépendants, ainsi qu'une dégénérescence musculaire extensive [49].

L'expression de la dystrophine chez *C. elegans* comme chez les autres organismes n'est pas limitée aux muscles, mais se fait aussi dans les cellules neuronales et le système reproducteur notamment [49].

En tant que modèle pour la myopathie liée à la déficience en dystrophine, les doubles mutants *dys-1* et *hlh-1* du ver *C. elegans* pourraient permettre notamment d'identifier de nouvelles molécules qui permettraient de contrer la dégénérescence musculaire et qui s'appliqueraient ensuite chez l'homme. Les avantages incontestables des nématodes par rapport à d'autres modèles animaux sont qu'ils font partie des modèles les plus aisément manipulables génétiquement. De plus leur multiplication par parthogénèse permet d'obtenir des clones facilement. On peut donc les obtenir en grandes quantités ce qui en fait un modèle idéal pour des études génétiques et pharmacologiques notamment.

II. Protéines associées à la dystrophine via le DGC, dont le rôle est précisé à l'aide des modèles animaux

A. D'autres protéines jouent un rôle similaire à la dystrophine

Peu après la découverte du gène de la dystrophine, le gène d'une protéine similaire, l'utrophine, a été découvert [51].

L'utrophine possède des similarités structurales et fonctionnelles avec la dystrophine. Même si l'utrophine ne possède pas exactement les mêmes fonctions que la dystrophine, elle apporte tout de même un important bénéfice aux muscles dystrophiques et permet de contrer plus ou moins l'absence ou le manque de dystrophine [52].

En plus de l'utrophine une expression augmentée d'autres protéines fonctionnelles telles que la laminine, sarcoglycane, sarcospane, intégrine et nNOS, ont également permis de réduire la dystrophie musculaire notamment chez le modèle souris [52].

En effet, les deux protéines intracellulaires syntrophine et dystrobrevine interagissent directement avec le domaine C-terminal de la dystrophine (*figure 1*). Les protéines sarcoglycanes, un subcomplexe de protéines transmembranaires et les protéines dystroglycanes, qui créent un lien directement entre la matrice extracellulaire et l'actine du cytosquelette peuvent également suppléer la dystrophine lorsque celle-ci est absente (*figure 1*) [3].

Des études chez le poisson-zèbre ont montré que lors de la diminution d'une de ces protéines, que ce soit la dystrophine ou une de celles qui s'y lient, certaines autres protéines de liaison se trouvent surexprimées.

Il est donc intéressant d'étudier davantage ces protéines qui semblent être une alternative possible lors d'absence de dystrophine pour continuer à assurer une stabilité entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire.

B. Rôles joués par l'Utrophine et l'Intégrine

Les protéines utrophine et intégrine remplissent la même fonction que la dystrophine et s'avèrent être surexprimées chez les souris mdx, en compensation du manque de dystrophine. Ceci est également confirmé chez le porc. L'utrophine est exprimée très faiblement au niveau du sarcolemme chez les jeunes porcelets DMD, puis au cours du développement de la dystrophie, l'utrophine devient détectable dans la plupart des fibres musculaires matures (*figure 14*). La même chose a été notée chez les patients DMD. Leur suppression chez des souris mdx aggrave le tableau clinique, tandis que leur surexpression limite l'atteinte musculaire [1]. En accord avec ces données, l'expression de l'utrophine dans le sarcolemme est aussi considérablement augmentée dans les muscles squelettiques des chiens cDMD âgés de 30 jours, 60 jours et chez les adultes. Chez les chiots et les porcelets DMD le manque de surexpression de l'utrophine au niveau du sarcolemme des muscles participe à la létalité de certains animaux peu de temps après leur naissance [33].

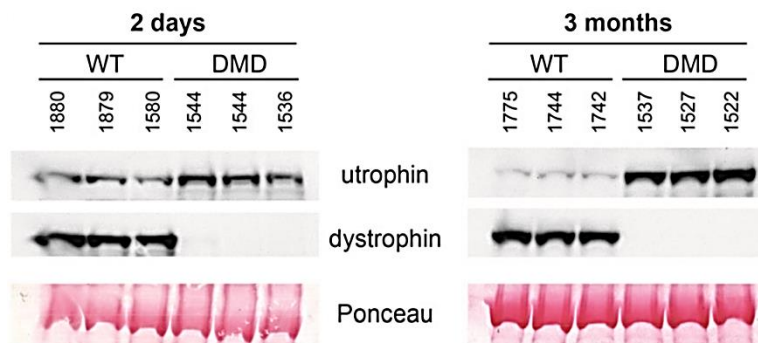


Figure 14 : Analyse de l'expression de l'utrophine chez des porcs DMD vs. Sauvages. Western blot qui montre que l'utrophine a tendance à être surexprimée chez les porcelets de 2 jours d'âge et est fortement surexprimée chez les porcs DMD de 3 mois d'âge, comparé aux contrôles sains de type sauvage. La coloration rouge Ponceau qui marque les membranes permet de montrer que les puits ont été remplis avec la même quantité, [33].

Des modèles de souris doublement mutées (double-knockout (dko)) utrophine/dystrophine et intégrine/dystrophine ont été créés pour préciser le rôle et l'implication de ces protéines [1]. Ces souris dko sont significativement plus petites comparées aux souris mdx uniquement déficientes en dystrophine et présentent une atteinte musculaire beaucoup plus sévère, ce qui rend leur phénotype similaire à celle des patients DMD.

Cependant, il est difficile de reproduire ce type de modèle souris et d'en prendre soin, car ces souris meurent souvent prématurément, comparé aux souris mdx et des études récentes suggèrent de trouver des modèles intermédiaires entre la souris mdx et les souris doublement mutées dko, tels que des modèles hétérozygotes pour l'utrophine [1].

C. Rôle joué par l'interaction dystroglycane/sarcoglycane-dystrophine

La protéine dystroglycane (Dg) est considérée comme une protéine jouant un rôle central lors des dystrophies musculaires, car elle se lie de manière directe ou indirecte à presque toutes les protéines dont les délétions entraînent des dystrophies musculaires. En effet, c'est une protéine transmembranaire qui fait partie d'un complexe qui lie la matrice extracellulaire à l'actine du cytosquelette via la protéine dystrophine cytoplasmique (*figure 1*). La dystrophine présente un site de liaison à l'actine sur sa partie N-terminale et le dystroglycane interagit via la partie C-terminale de la dystrophine [1]. Ces liens sont indispensables et la suppression d'un des composants ou d'un des liens unissant les différents composants peut entraîner une dystrophie musculaire et d'autres atteintes.

Le dystroglycane qui ancre la dystrophine au sarcolemme est également exprimé chez l'embryon et chez la larve du poisson-zèbre, ce qui permet d'étudier l'évolution de ses interactions au cours du développement [53]. L'abondance des protéines sarcoglycane et dystroglycane a également été évaluée dans les muscles squelettiques des porcs DMD par immunofluorescence ; et elle y était fortement réduite comme chez les patients humains DMD [33].

Le dystroglycane s'avère aussi être indispensable à la migration neuronale, même si son mécanisme d'action exact n'a pas encore été bien compris. Il serait impliqué dans la régulation de l'actine du cytosquelette, dans la transduction des signaux et dans la morphologie des cellules [47]. Il pourrait donc s'avérer intéressant chez les malades DMD qui présentent des signes neurologiques, comme nous le verrons dans la suite, pour essayer de contrer l'absence de dystrophine.

L'importance de l'interaction dystroglycane-dystrophine a été remarquée via l'étude des différents isoformes de la dystrophine, qui seront présentées par la suite. Dp71 notamment est l'isoforme non musculaire de la dystrophine la plus abondante, qui contient uniquement les domaines CR et Ct. En effet, lors d'une étude sur le domaine Ct de la dystrophine, qui porte les sites de liaison à la syntrophine et à la dystrobrevine (*figure 1*), il a d'abord été pensé que Dp71 pourrait restaurer certaines fonctions de signalisation de la dystrophine. Cependant, contre toute attente, la surexpression de Dp71 résulte en une clinique plus sévère chez la souris mdx et entraîne une myopathie chez les souris saines [1]. On s'est alors penché de plus près sur le domaine WW de la région charnière H4, qui est un module protéique d'environ 40 acides aminés, contenant deux domaines tryptophanes conservés (W) séparés de 20 à 22 acides aminés et qui se replie stablement en 6 feuillets, constituant ainsi un médiateur de l'interaction dystrophine-dystroglycane notamment. Ce dernier est partiellement tronqué chez Dp71 ce qui explique l'atteinte plus sévère et confirme l'importance de la liaison dystrophine/ dystroglycane. L'étude de l'isoforme de la dystrophine Dp116 qu'on retrouve dans les cellules de Schwann, permet d'apprécier le rôle que joue la liaison du dystroglycane. En effet, elle est composée des trois dernières répétitions spectrine-like, H4 et les domaines CR et Ct, ce qui conserve donc le site de liaison au dystroglycane. Même si la surexpression de Dp116 n'améliore pas la myopathie chez les souris mdx4cv (mutation ponctuelle de l'exon 53) et n'améliore pas non plus l'histopathologie chez les souris utrophine/dystrophine dko, sa surexpression augmente significativement l'espérance de vie chez ces souris utrophine/dystrophine dko, ce qui laisse encore une fois à supposer que l'interaction avec le dystroglycane est important [1].

Une autre étude portant sur les perturbations au niveau du complexe dystrophine-dystroglycane chez la drosophile montre l'apparition de dystrophies musculaires et de perturbations au niveau du système nerveux central. En effet, il s'avère que la drosophile constitue un excellent modèle animal pour la traçabilité génétique des dystrophies musculaires et des anomalies neuronales dues aux perturbations dans ce complexe dystrophine-dystroglycane. L'interaction dystrophine-dystroglycane s'avère être fortement conservée entre l'homme et la drosophile, ce qui suggère que les résultats trouvés chez la drosophile pourraient être utilisés chez l'homme. Des perturbations sur le gène ou sur l'ARN du dystroglycane et de la dystrophine induites chez la drosophile entraînent un défaut de polarisation des ovocytes, une mobilité réduite des mouches, une

dégénérescence musculaire âge-dépendante et un défaut de positionnement des axones des photorécepteurs. Le dystroglycane et la dystrophine sont aussi nécessaires pour permettre une migration neuronale correcte. Avec ce modèle, il a pu être montré que le complexe dystrophine-dystroglycane est notamment nécessaire dans le cerveau, pour les neurones des photorécepteurs et pour la migration des cellules gliales sur les axones. La matrice extracellulaire s'avère donc nécessaire à la migration axonale. Ces découvertes sont intéressantes notamment pour les patients DMD qui ont une atteinte du système nerveux [47].

Une étude chez des rats Dmd^{mdx} a montré que l'expression des protéines sarcoglycanes était diminuée dans les fibres musculaires par rapport aux rats sains (*figure 15*).

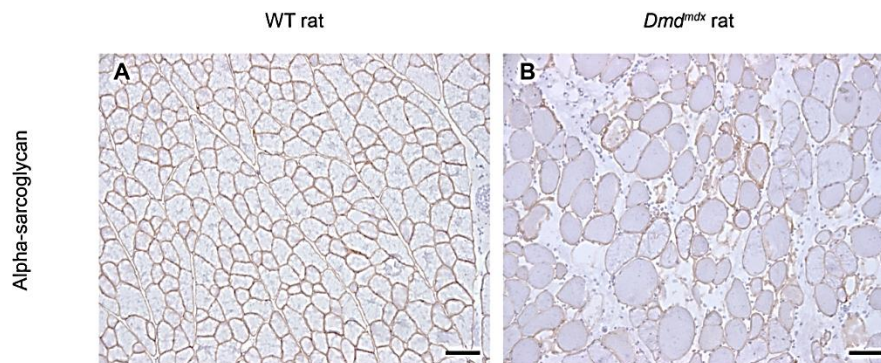


Figure 15 : Expression du sarcoglycane chez des rats sauvages et Dmd^{mdx} . L'absence de dystrophine dans les fibres des muscles squelettiques est associée à une forte diminution dans l'expression du sarcoglycane chez des rats Dmd^{mdx} . L'expression des protéines du complexe associé à la dystrophine a été évaluée sur des échantillons de muscle du biceps fémoral par immunohistochimie. Contrairement à une expression du sarcoglycane généralisée à tout le sarcolemme chez les rats sauvages (WT) (A), seulement quelques fibres expriment la protéine chez des rats Dmd^{mdx} de 7 mois (B). Échelle=100 μ m. [28]

Cela suggère que l'absence de dystrophine entraîne la diminution de certaines protéines qui lui sont associées, ce qui aggrave peut-être le tableau clinique et est à prendre en compte dans la maladie, notamment pour voir l'efficacité des traitements pour rétablir l'expression de la dystrophine, mais aussi des protéines qui lui sont associées et les liens qui s'établissent entre elles [28].

D. Interaction dystrobrevine/syntrophine-dystrophine

La dystrobrevine et la syntrophine font partie du DCG et interagissent donc avec la dystrophine. Le modèle *C. elegans* constitue un modèle intéressant pour l'étude des interactions entre ces différentes protéines associées [48]. Le génome de *C. elegans* code pour des homologues uniques des protéines dystrophine, dystrobrevine et syntrophine, dénommés respectivement *dys1*, *dyb-1* et *F30A10.8*. Ces protéines présentent les mêmes caractéristiques structurales que leurs homologues chez les mammifères, ce qui suggère que leur fonction a été conservée au cours de l'évolution. Cela fait donc de *C. elegans* un modèle d'étude potentiel des différentes interactions entre ces protéines, ainsi qu'un modèle d'étude de ce qui se passe si l'une de ces protéines telle que la dystrophine manque.

L'alignement de la dystrobrevine humaine avec celle de *C. elegans* montre une conservation de l'hélice H2 supérieure à celle de l'hélice H1 (*figure 16*).

Dystrobrevins

	abcdefg abcdefg abcdefg abcdefg abcdefg abcd	
hsDYB	ISFTIDA NKQQRQL LAELENK NREILQE IQRLRE HEQA	Helix 1
ceDYB	RSMNSSM VGDERIL IAQLEEE NSMMVRE MARLESQ TTSD	Identity : 25%
	abcdefg abcdefg abcdefg abcdefg abcdefg abcd	
hsDYB	LRLRQR KDELEQR MSALQES RRELMVQ LEGLMKL LKEE	Helix 2
ceDYB	LAGLRDR KMELEEK MFEMQQR RRELMVQ LEHLMAQ LNTG	Identity : 53%

Figure 16 : Alignement de la dystrobrevine humaine et celle de *C. elegans*. Région des hélices alpha formant le domaine coiled-coil. Les résidus identiques sont surlignés de noir. hsDYB: dystrobrevine humaine; ceDYB: dystrobrevine de *C. elegans*. Les lettres a à g désignent la position des résidus dans l'heptade, c'est-à-dire dans la répétition de 7 acides aminés, du domaine coiled-coil, [48].

Ces résultats suggèrent que pour la dystrophine dys-1, vue précédemment (figure 13), ainsi que pour la dystrobrevine dyb-1, la deuxième hélice H2 est la région critique conservée pour l'interaction dystrophine-dystrobrevine, tandis que l'hélice H1 ne semble pas indispensable. De plus, cette étude *in vitro*, en plus de montrer un lien entre la dystrophine et la dystrobrevine, a également montré qu'elles se liaient à la protéine syntrophine. Cependant, cette étude sur les interactions de ces protéines chez *C. elegans* montre qu'elles diffèrent tout de même de celles établies chez les mammifères, indiquant qu'il faut rester prudent quant à l'application des résultats obtenus chez *C. elegans* aux mammifères, même si ça permet d'avoir des premières idées.

Une étude sur le modèle porcin de la myopathie de Becker, montre que lors de déficit partiel en dystrophine, l'expression génétique, c'est-à-dire la quantité d'ARNm, des protéines dystrobrevine, sarcoglycane ou oxide nitric synthase (nNOS) est similaire chez les animaux malades et chez les contrôles sains, tandis que la quantité des protéines correspondantes elles-mêmes est diminuée. Une telle discordance entre l'expression génétique et l'expression protéique du DGC a également été rapportée chez d'autres modèles animaux, ainsi que chez des patients atteints de myopathie de Duchenne [36]. Malgré une expression génétique similaire, c'est au niveau de l'accumulation et de la localisation des protéines qu'on observe des défauts chez les malades, où les protéines présentent des difficultés à intégrer la membrane cellulaire. C'est un résultat important, indiquant qu'on ne peut pas se fier uniquement à l'expression génétique des différentes protéines, il faut qu'elles soient ensuite capables d'intégrer le bon endroit, ce qui dépend aussi des différents muscles. Ceci peut s'avérer important pour la suite lors de la thérapie génique entre autres, où on recherche à exprimer la protéine dystrophine manquante, mais où il faudra aussi veiller à ce qu'elle soit fonctionnelle, arrive à intégrer le complexe de protéines et s'y lie correctement.

Les études sur les embryons et larves du poisson-zèbre suggèrent que la localisation des protéines de la famille de la dystrophine et leurs ARNm sont régulées de manière complexe et précise lors des premiers stades de maturation des fibres musculaires [53].

III. Physiopathologie comparée de la myopathie de Duchenne et de Becker

A. Les manifestations cliniques chez l'homme

Les premiers signes cliniques de la maladie apparaissent en général vers l'âge de 3 ans, puis ils se stabilisent le plus souvent entre 5 et 8 ans ou n'évoluent que très lentement en l'absence de traitements. Une détérioration clinique rapide commence vers l'âge de 7-8 ans. Les individus atteints de myopathie de Duchenne ne sont plus ambulatoires vers l'âge de 10 ans et développent une cardiomyopathie vers l'âge de 16 ans. Le décès survient vers l'âge de 20 ans, en l'absence de traitement, avec une espérance de vie réduite d'environ 75% [1].

Cependant, avec l'utilisation de stéroïdes, la prise en charge des symptômes et des soins de support multiples, incluant notamment une ventilation nocturne des patients, l'espérance de vie des individus atteints est actuellement de 30 à 40 ans. Chez ces individus ce sont les complications cardiaques, telles que les cardiomyopathies ou les arythmies cardiaques, qui sont la cause principale de morbidité et de mortalité.

En 1955, Becker et Kiener décrivent une dystrophie musculaire progressive proche sur le plan clinique de la dystrophie musculaire de Duchenne, mais avec une évolution moins sévère. La dystrophie musculaire de Becker (BMD) présente une distribution de la faiblesse musculaire semblable à celle de la myopathie de Duchenne, mais avec une évolution moins sévère et moins rapide. Les premiers signes cliniques apparaissent en moyenne à 12 ans. La faiblesse musculaire est progressive, proximale et symétrique, et souvent associée à une hypertrophie musculaire. Elle entraîne des troubles de la marche. Parfois la faiblesse du quadriceps est le seul signe. L'utilisation d'un fauteuil roulant, si nécessaire, survient après l'âge de 16 ans. Comme dans la myopathie de Duchenne, une atteinte intellectuelle est possible. Cependant, à l'inverse de la myopathie de Duchenne dont le phénotype clinique est relativement homogène, la myopathie de Becker a un profil beaucoup plus hétérogène. Quelques manifestations atypiques lors de myopathie de Becker sont rapportées, telles que des crampes induites par l'exercice, des myalgies ou de la myoglobulinurie. Une cardiomyopathie peut être le signe clinique initial, sans faiblesse musculaire périphérique associée. Des patients complètement asymptomatiques ont également été rapportés, portant une délétion intragénique (figure 17) [54], [55], [56].

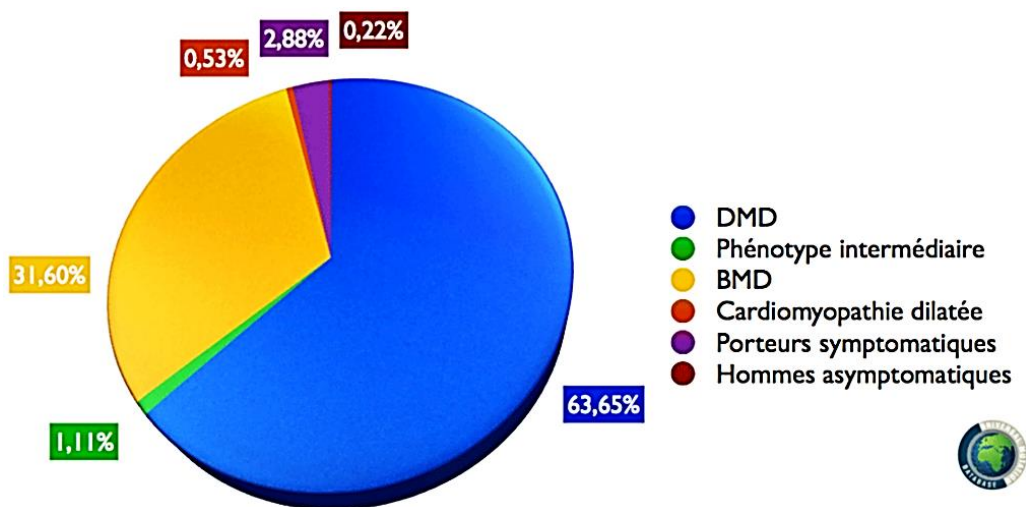


Figure 17 : Répartition des patients par phénotype clinique. Environ deux tiers des patients atteints de dystrophinopathie ont un phénotype clinique assimilable à une myopathie de Duchenne et un tiers environ à une myopathie de Becker. Les manifestations atypiques, type cardiomyopathie dilatée ou atteinte asymptomatique existent mais restent très rares, [15].

Malgré une évolution de la maladie similaire au cours de la vie des individus atteints de myopathie de Duchenne, une hétérogénéité des manifestations cliniques est constatée actuellement. Une étude rétrospective de 2009, sur 75 individus atteints de myopathie de Duchenne, exempts de tout traitement, a montré qu'il est possible de classer les individus malades en quatre catégories : infantile, classique, bon pronostic moteur et mauvais pronostic moteur, en se basant sur les atteintes intellectuelles et moteurs [57]. D'autres études ont mis en évidence que selon la quantité de dystrophine manquante le phénotype de la maladie était plus ou moins sévère (tableau

2). En effet, certains patients ayant moins de 10% du niveau normal de dystrophine présentent un phénotype DMD sévère, d'autres patients ayant un niveau de dystrophine de 15% ou moins affichent un phénotype DMD modéré à sévère et des patients atteints de myopathie de Becker, qui présentent donc un phénotype plus bénin, ont des niveaux de dystrophine supérieurs à 30% du niveau normal [42].

Tableau 2 : Corrélation entre la quantité résiduelle de dystrophine et le phénotype clinique. DMD : Duchenne Muscular Dystrophy, BDM : Becker Muscular Dystrophy, Q ; quantité, T : taille, N : normal, IHC : immunohistochimie, [57].

Groupe	Clinique	Western Blot dystrophine (Muscle)	Immunohistochimie dystrophine (fibres musculaires)	Cadre de lecture Région du gène
1	DMD sévère	0<Q<10% T normale(N)	0 ou fibres révertantes < 1%	Décalé
2	DMD modérée	0<Q<20% T normale(N)	IHC<50% qq f. révertantes (fr)	Décalé
3	Forme intermédiaire	20<Q<30% T N ou diminuée	50<IHC<90% fr groupées	Décalé ou conservé
4	BDM sévère	30<Q<65% T N ou diminuée	60<IHC<90%	Conservé (Nterminale)
5	BDM classique	65<Q<80% T N ou diminuée	IHC 100% irrégulière	Conservée (distale)
6	Forme bénigne	70<Q<100% T diminuée	IHC normale	Conservée (proximale)

Les deux formes de dystrophie musculaire (DMD et BMD) sont retrouvées chez les personnes portant des mutations similaires, ce qui suggère que le phénotype ne peut être déterminé en se basant uniquement sur la mutation génétique affectant le locus Xp21. D'autres facteurs jouent également un rôle dans le déterminisme du phénotype [58].

Il s'avère donc que certains éléments de ces deux maladies très similaires, les myopathies de Duchenne et de Becker, restent encore flous et c'est à travers les modèles animaux qui les modélisent que davantage de précisions sont recherchées (tableau 3).

Tableau 3 : Comparaison des caractéristiques pathologiques et fonctionnelles entre les patients et les modèles animaux de la myopathie de Duchenne, [28].

	Patient DMD	Chien cDMD	Porc DMD	Chat HFMD	Souris mdx	Rat Dmd ^{mdx}
Histopathologie musculaire						
Fibres révertantes	1 à 3%	<1%	ND	ND	5%	5%
Fibres nécrotiques	0,5 à 3,5%	2%	absentes	présentes	5%	>10%
Régénération	ND	15%	ND	présente	10%	10%
Calcification	modérée	modérée à marquée	ND	sévère	modérée	absente
Fibrose	marquée	présente	présente	essentiellement diaphragme	tardive & essentiellement diaphragme	marquée
Lipomatose	sévère	absente	absente	absente	absente	modérée
Cardiomyopathie	marquée, cause principale de décès	modérée	absente	présente	absente ou tardive	marquée
Fonction musculaire						
Diminution de la force	marquée	marquée	ND	ND	modérée	marquée
Locomotion	sévèrement dégradée	dégradée	dégradée	ND	normale	dégradée

B. Les manifestations cliniques chez le modèle souris mdx

Le modèle souris mdx a été découvert au début des années 1980 parmi une colonie de souris qui avaient un taux de créatinine kinase (CK) élevé et des signes histologiques de myopathie, tels qu'une dégénérescence puis une régénération des myofibres, ainsi qu'une activation de cellules satellites, comme en cas de dystrophie musculaire [19]. Les noyaux des cellules, qui sont périphériques dans la cellule en temps normal, se retrouvent au centre des fibres musculaires (*figure 18*), caractéristique qui peut donc être utilisée comme un marqueur de régénération des cellules musculaires lors d'analyses histologiques de muscles dystrophiques chez le modèle souris [12].

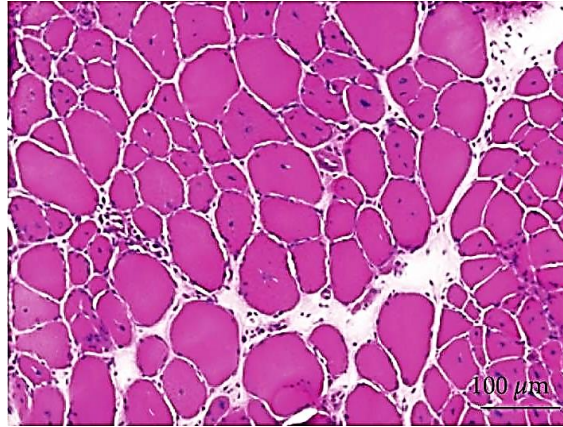


Figure 18 : Coupe histologiques du muscle tibialis anterior chez une souris mâle mdx52 de 6 semaines. L'aspect général est quasi normal. Les noyaux sont au centre des fibres musculaires. Présence d'une infiltration de cellules inflammatoires. Des fibres musculaires hypertrophiées sont également visibles. Echelle=100μm, [59].

Cependant, malgré la déficience en dystrophine, la souris mdx ne présente que peu de signes cliniques et son espérance de vie n'est réduite que d'environ 25% [1], contrairement aux humains atteints de la myopathie de Duchenne dont l'espérance de vie est réduite d'environ 75% (figure 19), comme vu précédemment.

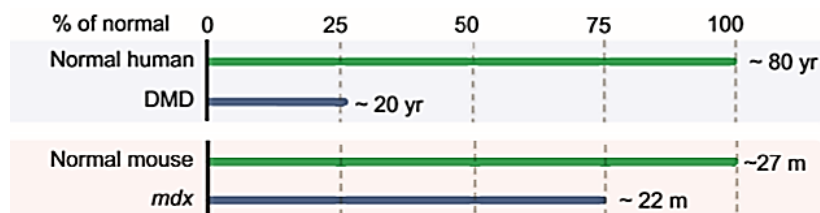


Figure 19 : Comparaison de l'espérance de vie chez l'homme atteint de myopathie de Duchenne et chez la souris mdx. [1].

La souris mdx présente plusieurs stades de progression de la myopathie, comme chez l'homme. Dans les deux premières semaines de vie de la souris, les muscles sont similaires à ceux d'une souris saine, puis entre trois et six semaines, les muscles commencent à nécroser. Ensuite, les muscles squelettiques entrent dans une phase stable, lors de laquelle il y a une régénération importante et qui est souvent associée à une hypertrophie des muscles des membres. Les atteintes sévères, qu'on retrouve chez l'homme, comprenant fonte musculaire, scolioses et insuffisances cardiaques, surviennent rarement chez des individus de moins de 15 mois (tableau 4), [1]. De plus, il a été noté qu'une partie significative des souris mdx d'un certain âge, développent des rhabdomyosarcomes, type d'atteinte qui n'est pas observé chez l'homme.

Tableau 4 : Comparaison de la sévérité de l'atteinte lors de myopathie de Duchenne chez des souris et des hommes déficients en dystrophine, [1].

	Souris	Homme
Manifestations cliniques		
Poids de naissance	=normal	=normal
Poids adulte	>normal	<normal
Evolution clinique	modérée, non-progressive	sévère, progressive
Espérance de vie	=75% de la normale	=25% de la normale
Mortalité néonatale	Rare	Rare
Age d'apparition des premiers symptômes	>15 mois	2 à 4 ans
Perte d'ambulation	Rare	Commun au début de l'adolescence
Dégénérescence musculaire	Minimale jusqu'à >15 mois	Progressive
Anormalités à l'ECG	Fréquent	Fréquent
Cardiomyopathie	>20mois; dilatée (femelles) et hypertrophique (mâles)	Evidente à 16 ans
Anomalies du SNC et cognitifs	Modérées	Un tiers des individus touchés
Histopathologie		
A la naissance	Minimale	Minimale
Nécrose aiguë	2 à 6 semaines	Aucune
Fibrose des muscles des membres	Minimale chez l'adulte	Extensive et progressive
Régénération musculaire	Importante	Faible

Bien que le phénotype chez la souris soit fortement atténué en comparaison à celui des humains atteints de myopathie de Duchenne, le modèle souris mdx a été précieux pour l'étude des mécanismes de la maladie, ainsi que pour l'étude de potentiels traitements géniques, cellulaires et pharmacologiques, comme nous le verrons par la suite. De nombreuses connaissances concernant la biologie moléculaire de la dystrophine et des protéines qui y sont associées, ainsi que leurs interactions viennent d'études sur le modèle souris mdx, [60]. Elle a aussi permis de mieux évaluer l'impact de l'inflammation et de la mise en place de fibrose lors des myopathies, [61].

C. Evolution du modèle souris pour approcher au mieux la clinique de l'homme

Le modèle souris mdx déficient en dystrophine ne manifeste que peu de signes cliniques, ce qui pourrait être lié à une sur-régulation de mécanismes compensateurs ou à des propriétés particulières du muscle liés à l'espèce. C'est donc via une élimination de ces mécanismes compensateurs qu'on essaie « d'humaniser » le modèle souris, pour approcher au mieux le phénotype humain de myopathie de Duchenne. Les différences phénotypiques observées chez les humains atteints ont aussi pu être modélisées avec de nouveaux modèles souris, obtenues par croisement avec d'autres modèles souris, présentant des atteintes davantage neurologiques, des déficiences immunitaires, plus ou moins de fibrose etc. Les nouveaux modèles varient donc peu du modèle de base mdx, mais ont chacun leur particularité. Le modèle DBA/2-mdx, obtenu par croisement de souris mdx avec des souris DBA/2, en est un exemple. En effet, la souris DBA/2 présente, suite à plusieurs cycles de dégénérescence et de régénération, une perte de masse musculaire et une diminution du nombre de myofibrilles. De plus, la capacité de régénération de ses cellules satellites est plus faible que celle des souris mdx. Le croisement des modèles souris mdx et DBA/2 est donc à l'origine d'un modèle souris qui présente plus de fibrose et moins de régénération que le modèle mdx initial, [62]. Cependant le modèle DBA/2 est un modèle difficile à faire reproduire

selon le laboratoire (Jackson Laboratory) qui les génère car les portées sans petites et les individus faibles.

Par ailleurs, deux autres approches ont été utilisées afin de réduire la régénération importante qui est présente chez la souris mdx. Une des études a éliminé un régulateur myogénique majeur appelé MyoD, résultant en un double mutant MyoD/dystrophine, comme cela a été fait pour le modèle animal *C. elegans*. Ce modèle souris doublement muté présente une myopathie marquée, une cardiomyopathie dilatée et une mort prématurée, [1]. L'autre approche prend en compte le fait que la longueur des télomères dans les muscles est réduite chez les patients atteints de myopathie de Duchenne [63], ce qui n'est pas le cas chez la souris mdx, où la longueur des télomères est mieux conservée, et contribue donc à une capacité de régénération musculaire plus importante, [1]. Pour maintenir la taille du télomère, l'ARN Télomerase (mTR) est nécessaire. Un modèle de souris mTR/mdx doublement muté a donc été créé, ce qui engendre des souris avec une fonte musculaire plus importante et des insuffisances cardiaques. Leur espérance de vie est réduite à environ 12 mois, [1].

Beaucoup d'autres modèles souris ont été créés en jouant sur les interactions cytosquelette/matrice extracellulaire, la réparation musculaire, l'inflammation et la fibrose, afin de trouver des modèles souris dont l'intensité de la myopathie se rapproche le plus de ce qui se trouve chez l'homme (figure 20), [Annexe 1].

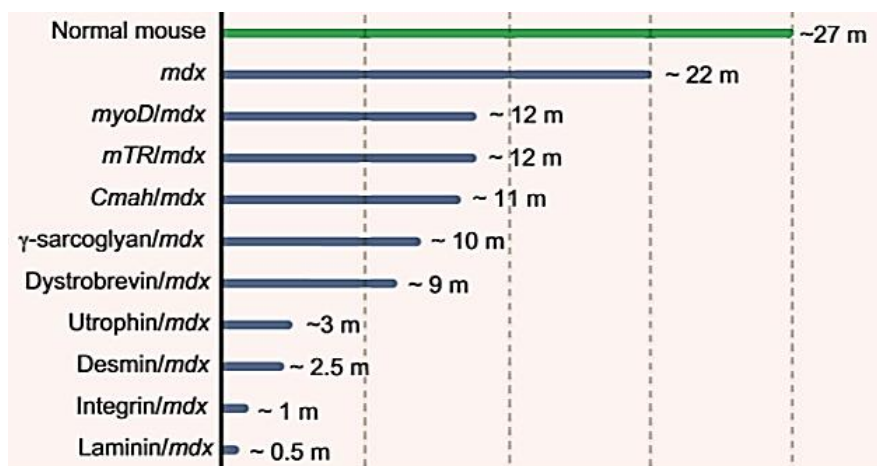


Figure 20 : Comparaison de l'espérance de vie chez la souris mdx et les modèles qui en découlent. [1]

La recherche de ces modèles permet aussi au fur et à mesure de montrer l'importance de certains composants dans le cadre des myopathies de Duchenne et de Becker, tels que le facteur myogénique MyoD, la télomerase mTR et de certaines protéines telles que la cytidine monophosphate sialic acid hydroxylase (Cmah), une enzyme naturellement inactive chez l'homme. Chez la souris elle permet, via une hydroxylation, l'expression à la surface de nombreuses cellules, d'un acide qui intervient notamment dans les interactions cellule/cellule. Les souris doublement mutées Cmah/mdx ont un phénotype de myopathie de Duchenne plus sévère que celui du modèle mdx [64].

Pour conclure, la large collection de modèles souris croisées et doublement mutées a permis d'étendre largement les modèles potentiels pour les études précliniques. L'accélération de l'évolution de la maladie dans ces modèles donne l'opportunité non seulement d'obtenir les résultats de thérapies expérimentales plus rapidement, mais également de confirmer ou non plus rapidement si un traitement peut réellement améliorer cliniquement les manifestations de la myopathie et donc espérer augmenter l'espérance de vie. Cependant, il y a également des limites à ces modèles, car ce sont souvent des modèles difficiles à élever et pas toujours disponibles à l'achat. De plus, il est

important de noter, que contrairement à l'homme atteint de myopathie de Duchenne, les modèles souris utilisés ne présentent pas uniquement la mutation au niveau du gène de la dystrophine, mais également d'autres mutations, dont l'impact reste incomplètement connu.

D. Les manifestations cliniques chez les modèles canins, cDMD

La dystrophie musculaire canine, liée au chromosome X, a été décrite dans la littérature depuis plus de 50 ans [1].

Généralement, le phénotype clinique canin de la myopathie de Duchenne est plus sévère que celui des modèles murins mdx et c'est pour cela que le modèle canin, cDMD, est considéré comme étant un meilleur modèle pour la myopathie de Duchenne humaine (*tableau 5*). En effet, les chiens cDMD présentent une évolution clinique remarquablement similaire à celle des jeunes garçons atteints de la myopathie de Duchenne [1].

Tableau 5 : Comparaison des atteintes cliniques et histopathologiques du chien cDMD et de l'homme atteint de myopathie de Duchenne, [1].

	Chien	Homme
Manifestations cliniques		
Poids de naissance	=normal	=normal
Poids adulte	<normal	<normal
Evolution clinique	Sévère, progressive	sévère, progressive
Espérance de vie	=25% de la normale	=25% de la normale
Mortalité néonatale	~25% des chiens atteints	Rare
Age d'apparition des premiers symptômes	Naissance à 3 mois	2 à 4 ans
Perte d'ambulation	Peu commun	Commun au début de l'adolescence
Dégénérescence musculaire	Progressive	Progressive
Anormalités à l'ECG	Fréquent	Fréquent
Cardiomyopathie	Détectable à 6 mois par échocardiographie	Evidente à 16 ans
Anomalies du SNC et cognitifs	absence de données	Un tiers des individus touchés
Histopathologie		
A la naissance	Minimale	Minimale
Nécrose aiguë	Aucune	Aucune
Fibrose des muscles des membres	Extensive et progressive	Extensive et progressive
Régénération musculaire	Faible	Faible

La faiblesse au niveau des membres et l'intolérance à l'effort commencent en général vers 2-3 mois, ce qui correspond approximativement à l'âge de 3 ans auquel commencent les mêmes symptômes chez les jeunes garçons. L'atrophie musculaire, l'atteinte articulaire, l'hypersalivation, la dysphagie, la démarche anormale et le début d'atteinte cardiaque deviennent visibles autour des 6 mois d'âge. Vers 6 à 10 mois, la maladie ne progresse pratiquement pas, puis la mort survient le plus souvent vers l'âge de 3 ans, ce qui correspond à une diminution de l'espérance de vie chez le chien cDMD d'environ 75%, comme c'est le cas chez l'homme (*figure 21*) [1].

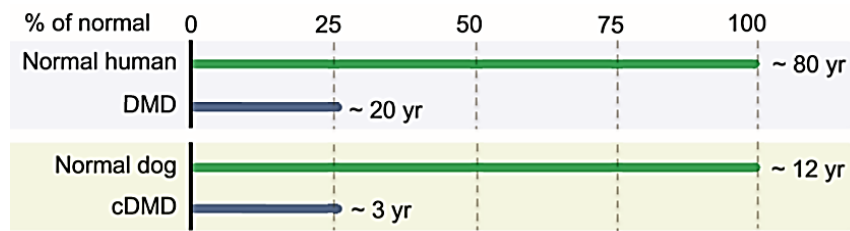


Figure 21 : Espérance de vie comparée des hommes et chiens sains avec ceux atteints de déficience en dystrophine. [1]

Davantage d'études moléculaires, histologiques et cliniques ont permis de valider le modèle canin GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy) comme un modèle authentique pour l'étude de la myopathie de Duchenne. Actuellement, les colonies de ces chiens sont présentes aux USA, en France, au Brésil et en Australie. Le début des signes cliniques se manifeste déjà *in utero* pour le modèle GRMD, avec le développement de lésions au niveau du muscle de la langue [1]. En effet, à la naissance ces chiots ont en général déjà des difficultés à téter et doivent être nourris. Vers 6 semaines d'âge on note du trismus, puis certains muscles s'atrophient en commençant par les muscles temporaux et les muscles du tronc (*figure 23*). De plus, ces chiens présentent une plantigradie due à une hyperextension de l'articulation des carpes et une hyperflexion aux articulations tibiotarsales (*figure 22*). Une salivation excessive suggère une atteinte des muscles pharyngés (*figure 23*). Ces chiens présentent d'abord une cyphose, puis progressivement une lordose. Comme chez les patients DMD, paradoxalement certains muscles présentent de l'hypertrophie, ce qui avait également été noté avec le modèle souris mdx. Des pneumonies par aspiration peuvent survenir suite à l'atteinte du pharynx ou de l'œsophage. Une insuffisance cardiaque suite à la cardiomyopathie est également possible [2]. De grosses variations sont possibles dans la sévérité de la maladie chez le chien cDMD comme chez l'homme. Certains chiens décèdent peu après la naissance suite à d'importantes difficultés respiratoires et d'autres présentent un phénotype très atténué [65]. Il y a des avis différents selon les articles sur une possible corrélation entre la taille/le poids de l'animal et la sévérité de son atteinte [2].



Figure 22 : Plantigradie caractéristique chez un chien cDMD (GRMD) de 6 mois. Les membres pelviens sont ramenés vers l'avant. L'angle formé par l'articulation tibiotarsale (traits noirs) est d'environ 110° contre 140° en temps normal. On note également une hyperextension des carpes, [2].



Figure 23 : Chien mâle cDMD (CXMDJ) de 6 mois. On note une atrophie des muscles sur tout le corps, incluant les muscles temporaux. Il présente également une cyphose, une position assise anormale et une contracture au niveau des articulations des membres pelviens, [59].

Comme c'est le cas chez les hommes atteints de myopathie de Duchenne, les chiens cDMD peuvent avoir des manifestations cliniques différentes. En effet, les observations cliniques des caractéristiques musculosquelettiques, morphologiques, gastro-intestinales, respiratoires, cardiovasculaires et rénales ont permis de mettre en évidence trois phénotypes différents chez ces chiens dystrophiques, bénin (grade I), modéré (grade II) et sévère (grade III) [58]. Ces trois groupes ne montrent pas de différences au niveau de la morphologie des muscles dystrophiques, ni au niveau des mesures de créatine kinase. Être conscient de ces différences phénotypiques chez ce modèle animal est primordial pour une interprétation et une compréhension correcte des résultats obtenus lors des essais précliniques. L'identification et la classification de ces trois phénotypes montre une importante variabilité clinique inter et intra familiale, qui est aussi observée chez les patients DMD et qui ne peut être attribuée à des facteurs génétiques [66]. Cependant une corrélation entre la quantité de dystrophine et la sévérité du phénotype est supposée comme vu précédemment. De plus, il semblerait que l'augmentation de certaines protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, telles que la caséine kinase I, entraîne un phénotype de dystrophie plus bénin [67]. Il serait donc intéressant d'étudier chez les chiens cDMD, si des quantités de dystrophine différentes pourraient expliquer les différences de phénotypes observées. Par ailleurs, les variations phénotypiques des porteurs d'une mutation au niveau de la dystrophine peuvent être expliquées par un possible processus d'inactivation soit du chromosome X, muté ou normal [68].

Le chien GRMD avec ses trois phénotypes différents constitue donc un modèle intéressant pour l'étude des myopathies de Duchenne et de Becker, car il présente la plupart des signes cliniques présents chez l'homme. De plus, comme chez l'homme, certains cas extrêmes ont été rapportés, où malgré une absence totale de dystrophine dans les muscles, les chiens restaient asymptomatiques, [1].

Cependant, on peut noter quelques particularités du modèle cDMD. En effet, on observe que 20 à 30% des chiots cDMD décèdent au cours des deux premières semaines de vie probablement à cause d'une faiblesse diaphragmatique, tandis que cette mortalité néo-natale n'est pas notée dans l'espèce humaine. Un retard de croissance est également spécifique à l'espèce canine. Une étude (non publiée) sur plus de 50 chiens montre que le poids des chiots cDMD entre 1 et 6 mois d'âge, n'atteint qu'environ 80% puis 60% du poids normal à cet âge [1]. En général, les patients DMD ne sont plus ambulateurs vers le début de l'adolescence, alors qu'une perte totale de motricité n'est pas vraiment retrouvée chez les jeunes chiens cDMD.

En dehors de la ressemblance des manifestations cliniques entre humains et chiens atteints de myopathie de Duchenne, les chiens cDMD présentent aussi des lésions histologiques similaires à ceux de l'homme DMD (*tableau 6*). C'est le cas par exemple de la fibrose musculaire au niveau des membres, qui est une caractéristique principale chez les humains atteints de myopathie de Duchenne et chez les chiens cDMD, alors que ce n'est pas le cas chez les souris mdx. En effet,

l'importante régénération musculaire qui est observée chez les souris via le noyau central des fibres musculaires, contribue à avoir un phénotype plus atténué de la maladie, alors que chez les humains atteints de myopathie de Duchenne ainsi que chez les chiens cDMD, la proportion de fibres musculaires présentant un noyau central est beaucoup plus faible [1].

Tableau 6 : Grades des lésions pour les muscles dystrophiques du chien cDMD colorés à l'hématoxyline, éosine et trichrome gomori modifié, [26].

Grade	Lésions	Caractéristiques histologiques
0	Absentes	Muscle présentant les mêmes caractéristiques histologiques que les muscles sains sans anomalies
1	Faibles	Fibres musculaires endommagées isolées à distribution aléatoire
2	Modérées	Fibres musculaires endommagées en amas à distribution multifocale et touchant 10-50% des fibres dans chaque coupe transversale de muscle
3	Sévères	Fibres musculaires endommagées coalescentes ou à distribution multifocale touchant plus de 50% des fibres dans chaque coupe transversale de muscle

Par ailleurs, il a été constaté avec le modèle canin, que les lésions macroscopiques et histopathologiques varient fortement avec les muscles déficients en dystrophine [1]. Au petit grossissement du microscope, on observe de petits groupes de myofibres nécrosées et en cours de régénération, ce qui est typique de la dystrophie musculaire due à une déficience en dystrophine chez toutes les espèces. C'est donc un bon moyen d'orienter le diagnostic et d'évaluer l'atteinte du manque de dystrophine. De plus, il a pu être mis en évidence que la variation dans le diamètre des fibres musculaires venait de l'hypertrophie des myofibres individuelles, associée à une forte augmentation de petites fibres qui se régénèrent. Les myofibres nécrotiques montrent différents stades de dégénérescence, allant de myofibres gonflées, granuleuses (hyalines ou hypercontractées) qui sont colorées fortement par un colorant H&E, à des fibres fragmentées qui se nécrosent et se minéralisent (calcification), présentant un infiltrat de macrophages (myophagocytose) et d'autres cellules inflammatoires mononucléaires. Plus précisément, il a pu être montré que quand le matériel nécrotique est éliminé par le système monocytes-macrophages, ne persistait que la lame basale des myofibres affectées, ce qui résulte en des tubes de sarcolemme vides. La régénération des fibres se fait plutôt par groupes de fibres, souvent proche de zones de nécrose. Ces fibres sont plutôt petites avec un noyau proéminent et présentant un cytoplasme basophile. Le noyau de la myofibre se situe plutôt au centre qu'en périphérie, ce qui va être un critère important dans les études pour la caractérisation des fibres en régénération (*figure 24*).

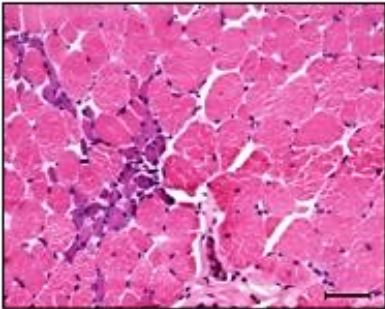
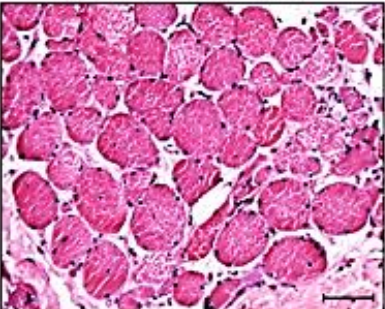
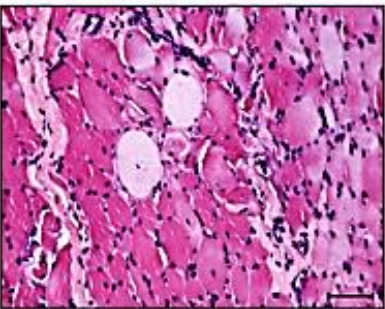
Phenotype	CK (mean \pm SD / min. – max.)	Musculoskeletal alteration	Morphology
Mild/ Grade I	15858.5 \pm 7299.9 5644.4 - 32440.0	Carpal overflexion Carpal <i>varum</i> Stifle hypomobility	 Photomicrograph of dystrophic muscle of a grade I dog. HE, scale bar = 50 μ m
Moderate/ Grade II	13273.0 \pm 10438.4 6050.0 - 35836.0	Grade I alteration + Tarsal overflexion and <i>genu varum</i> <i>Genu valgum</i> Mild hypotrophy	 Photomicrograph of dystrophic muscle of grade II dog. HE, scale bar = 50 μ m
Severe/ Grade III	18089.3 \pm 9261.2 3925.0 - 33022.0	Grade II alteration + General hypotrophy	 Photomicrograph of dystrophic muscle of grade III dog. HE, scale bar = 50 μ m

Figure 24 : Description des signes cliniques et pathologiques chez trois Golden retrievers cDMD aux phénotypes différents. L'histologie des muscles montre des lésions caractéristiques de dystrophie musculaire avec une variabilité de la taille des fibres, une dégénérescence, une fibrose, une régénération des fibres et de la nécrose. Ce processus de dégénérescence est observé dans les trois groupes de chiens quelque soit le phénotype. Les niveaux de créatine kinase sont élevés de manière similaire dans les trois groupes. Les fragments musculaires ont été prélevés sur le muscle vastus lateralis de 15 chiens. CK = créatine kinase, [58].

On observe aussi des modifications caractéristiques de l'absence ou du manque de dystrophine au microscope électronique [1], avec une organisation des myofibres perturbée, une dilatation du réticulum sarcoplasmique, une augmentation du glycogène, une hyperplasie et une hypertrophie des mitochondries. Il faut cependant rester prudent sur le type de muscles qui sont atteints lorsqu'on évalue les résultats fonctionnels et pathologiques lors des études précliniques. En effet, comme chez les patients DMD et chez la souris mdx, les muscles extraoculaires par exemple sont largement épargnés chez le modèle canin GRMD, contrairement aux muscles fortement sollicités *in utero* et lors des premiers jours de vie, tels que la langue, le diaphragme, et les fléchisseurs des membres (sartorius, semi-tendineux, tibial crânial), présentant une forte nécrose. Certains muscle sont épargnés au début, puis développent des lésions par la suite. Ce phénomène de

nécrose retardé touche plutôt les muscles extenseurs, qui probablement ne sont affectés qu'à partir du moment où le chien se met à marcher, et les muscles tels que le quadriceps fémoral qui subissent des contractions excentriques. Les muscles atteints de nécrose tôt, se régénèrent ensuite, voire s'hypertrophient. Le phénomène est bien illustré avec le muscle sartorius crânial, utilisé de ce fait dans de nombreuses études. En effet, il récupère bien de sa nécrose initiale, puis peut atteindre deux à trois fois sa taille normale. Chez le chien GRMD, des études histologiques morphométriques montrent que le muscle sartorius crânial présente une forte hypertrophie chez les chiens âgés de 4 à 10 mois. Le muscle est ensuite remplacé par du gras et du tissu conjonctif, correspondant à la pseudohypertrophie déjà classiquement décrite chez les patients DMD et dont l'étude à travers le modèle chien permet de mieux la préciser.

Différents tests ont été développés sur le modèle cDMD, afin de pouvoir évaluer de manière objective l'évolution de la maladie, ce qui a permis leur utilisation dans des essais précliniques et cliniques, lors d'études génétiques, cellulaires et pharmacologiques. Parmi eux des mesures de force musculaire, le but étant de trouver une mesure, telle que la flexion tétanique du muscle tibiotarsal, qui permette le mieux d'évaluer l'efficacité des traitements, car c'est une mesure avec le moins de variabilité comparé aux contractions répétées et aux extensions [2]. On observe le développement de plusieurs tests standardisés pour comparer la maladie chez l'homme et chez l'animal. Le test de marche de 6 minutes (6-min walk test) est devenu un paramètre standard dans l'évaluation des patients DMD par exemple [69].

Par ailleurs, l'IRM a été de plus en plus utilisée dans le but de fournir davantage de résultats fiables, notamment pour les réponses aux traitements (*figure 25*) [2]. En effet, ces résultats concordent avec ceux obtenus lors de tests cliniques fonctionnels. Certaines études laissent même penser que l'IRM donne des résultats plus fiables que ceux obtenus avec les tests fonctionnels sur la prédiction de l'évolution de la maladie [70]. En effet, l'IRM a été utilisée pour monitorer la progression de la maladie de Duchenne lors d'essais avec d'éventuels traitements [71].

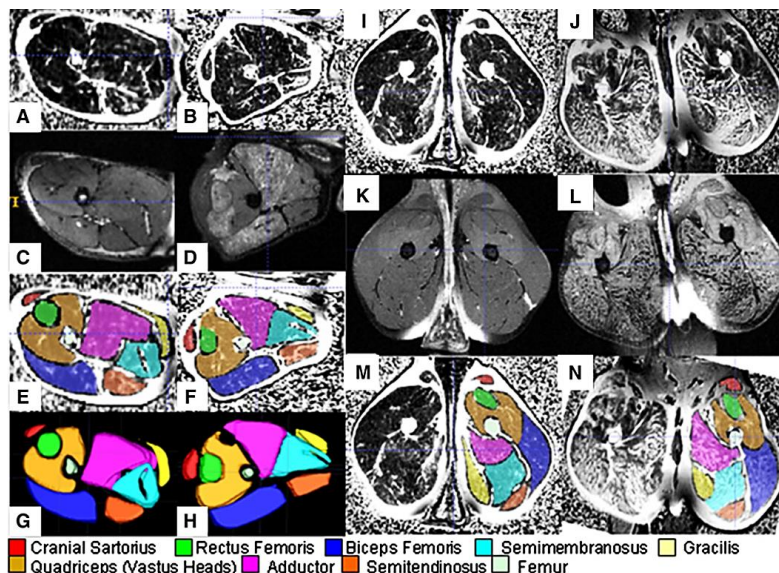


Figure 25 : Etudes IRM chez des chiens cDMD (GRMD). Les quatre images de gauche à droite sont des images d'un chiot sain de 4 mois (a, c, e, g) et d'un chiot de la même portée malade (b, d, f, h), ainsi que d'un chien sain de 5 ans (i, k, m) et d'un chien malade de 7 ans (j, l, n). a, b, i et j / TSE-fat percentage et c, d, k et l / TSE-fat saturation. Les coupes transversales de muscles ont été segmentées sur les images e, f, m et n, afin de faciliter les mesures de certaines régions d'intérêt et sont représentées en trois dimensions sur les images g et h (chiots de 2 mois uniquement). On peut noter en particulier l'intensité des lésions dans plusieurs muscles sur les images d et j, signes d'accumulation aiguë de fluide et de modifications chroniques des graisses. L'intensité des lésions vues en j, contraste avec l'accumulation de graisses vues en l. Les segmentations ont été réalisées avec ITK-SNAP (<http://www.itksnap.org/pmwiki/pmwiki.php>), [2].

En outre, l'électromyographie (EMG) a été testée sur les modèles canins [72]. Elle permet d'évaluer de manière objective le muscle lors des études. En effet, lors de myopathie de Duchenne et de Becker, comme lors d'autres myopathies, on observe de petits potentiels polyphasiques de courte durée (short-duration motor unit potentials (MUPs)), associés à une activité spontanée, allant de simples fibrillations à des décharges complexes et répétées (complex repetitive discharges (CRDs)). Les anomalies dans les EMG étaient rarement présentes chez les chiots cDMD de 6 semaines mais facilement visibles à l'âge de 8-10 semaines. Les résultats obtenus lors des études d'EMG chez les chiens cDMD concordent avec les modifications notées chez les patients DMD, ce qui en fait une méthode d'étude intéressante, même si quelques différences existent, comme les CRDs qui sont plus importants chez les chiens.

Il est aussi possible d'enregistrer des potentiels d'action sur les fibres musculaires individuelles (Single-fiber EMG (SFEMG)) (figure 26) [2]. Deux paramètres en particulier sont mesurés, la conductivité, qui traduit l'instabilité de la fibre musculaire, et la densité de la fibre musculaire, qui permettent d'avoir un aperçu de mécanismes qui mènent à la maladie neuromusculaire. La conductivité de la fibre musculaire représente la vitesse avec laquelle le potentiel d'action du nerf est transmis au travers de la jonction neuromusculaire et est une moyenne des intervalles consécutifs entre les potentiels. En effet, plus de 40% des patients DMD ont une conductivité de la fibre musculaire diminuée, probablement due à des jonctions neuromusculaires anormales, associées à des fibres musculaires malades ou régénérées. La densité des fibres musculaires est basée sur le nombre de potentiels d'action de fibres musculaires individuelles, enregistrés au même moment par l'électrode. Il a été constaté que les patients DMD avaient une densité de fibres musculaires augmentée, sûrement suite à la prolifération et régénération des fibres musculaires. Les chiens malades eux présentent une conductivité diminuée au niveau des muscles, avec des valeurs de ~30ms au lieu de ~15ms chez les chiens sains sur les mêmes muscles. De plus, les chiens malades présentent davantage de blocage des potentiels, comparé aux chiens sains. Il a aussi été conclu à une augmentation de la densité des fibres musculaires chez les chiens cDMD, suite au plus grand nombre de potentiels d'action enregistrés à chaque site de stimulation.

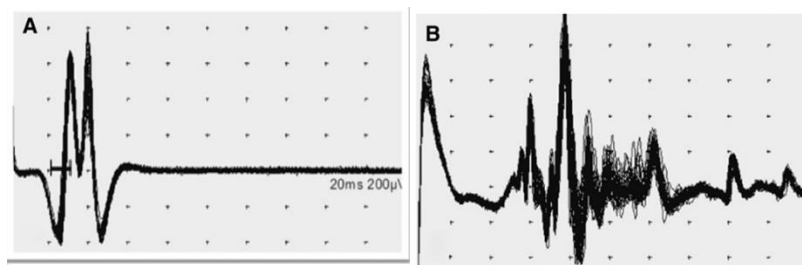


Figure 26 : Représentation des potentiels d'action de fibres musculaires individuelles (sSFEMG) sur le muscle peroneus longus chez des chiens normaux (A) et chez des chiens cDMD (B). Le chien normal a une excitabilité neuromusculaire minimale et seulement quelques potentiels d'action au site d'enregistrement, tandis que le chien cDMD présente une excitabilité de la fibre musculaire augmentée et davantage de potentiels d'action [2]. Echelle 20ms ; 200µV.

Les chiens cDMD permettent donc de standardiser les mesures que l'on peut faire pour évaluer l'évolution de la maladie sur les muscles notamment et de voir ainsi l'effet bénéfique de certains traitements.

Pour conclure, les chiens cDMD ont beaucoup de caractéristiques en commun avec les humains atteints de myopathie de Duchenne, ce qui en fait un excellent modèle pour effectuer des études précliniques. Par ailleurs, le modèle cDMD en plus des similitudes symptomatiques avec les patients humains, présente aussi des lésions histologiques similaires. Il est donc possible d'évaluer

différentes approches thérapeutiques avec le modèle chien cDMD, via des mesures et des études objectives.

E. Manifestations cliniques chez le modèle rat

Les rats Dmd déficients en dystrophine présentent une diminution de la force musculaire, ainsi qu'un phénotype de dégénérescence/régénération dans les muscles squelettiques, le cœur et le diaphragme. Ces rats sont plus petits et moins lourds lorsqu'ils sont comparés aux contrôles non atteints. Il semblerait que comme vu précédemment, les rats soient des modèles prometteurs pour l'étude des myopathies de Duchenne et de Becker, intermédiaires entre la souris mdx et le chien cDMD.

En effet, à l'âge de 3 mois les muscles des membres et du diaphragme chez les rats Dmd présentent une nécrose sévère associée à une régénération. A 7 mois, ces muscles présentent ensuite une fibrose marquée, ainsi qu'une infiltration par du tissu adipeux. Cela entraîne une diminution importante de leur force musculaire, ainsi qu'une diminution de leur activité motrice spontanée. La croissance de ces rats est fortement altérée dès 4 semaines d'âge. Chez ces rats Dmd le niveau des CK est multiplié par 10 comparé aux contrôles sains, ce qui suggère que la déficience en dystrophine entraîne une fragilisation des membranes musculaires [28].

Afin d'évaluer comment l'absence de dystrophine affecte la fonction musculaire, un test d'agrippement a été mis en place sur des rats Dmd de 3 mois. Il montre une forte diminution dans la force d'agrippement des pattes thoraciques, représentatif d'une altération générale des performances musculaires de tout le corps. En effet, au premier essai les rats Dmd exercent une force 30% moins importante que les contrôles sains. Ces contrôles sont capables de maintenir leur force sur cinq tractions successives, tandis que celle des rats Dmd diminue de 70% au bout des cinq tractions. Ce test illustre la faiblesse musculaire des rats Dmd.

Par ailleurs, une fibrose sévère dans tous les muscles squelettiques ainsi que dans le muscle cardiaque a été notée chez ces rats Dmd (*figure 27*), comme c'est le cas chez les patients DMD, alors que ce n'est pas le cas chez les souris mdx.

De plus, à travers les études il a été montré que l'altération de l'homéostasie du Ca^{2+} était un point essentiel lors de l'initiation de l'endommagement des fibres musculaires. Or chez le rat Dmd aucune calcification n'est notée au niveau des lésions mêmes sévères dans les muscles squelettiques. Il serait donc intéressant d'étudier la régulation du calcium dans ce modèle dystrophique, en vue notamment de découverte de traitements préventifs [28].

Lors de la progression de la maladie chez les patients DMD, les myofibres sont remplacés par des adipocytes. Or, l'expression de Perilipin, un marqueur d'adipocytes, s'est révélée élevée chez certains rats Dmd. L'immunomarquage au Oil Red O montre également la présence de tissu adipeux dans les espaces intramusculaires, mais aucune myofibre n'est remplacée par des adipocytes contrairement à chez l'homme, dans des stades avancés de la maladie. Davantage d'études s'avèrent donc nécessaires afin de voir si les phénotypes associés à l'âge (dégénérescence musculaire, fibrose, substitution des myofibres par des adipocytes) sont retrouvées chez le rat Dmd, afin de mieux comprendre ce phénomène chez l'homme et peut-être pouvoir le traiter par la suite. Des différences dans la taille des myofibres sont également notées, ce qui est caractéristique de la dystrophie musculaire dans de nombreuses espèces [29].

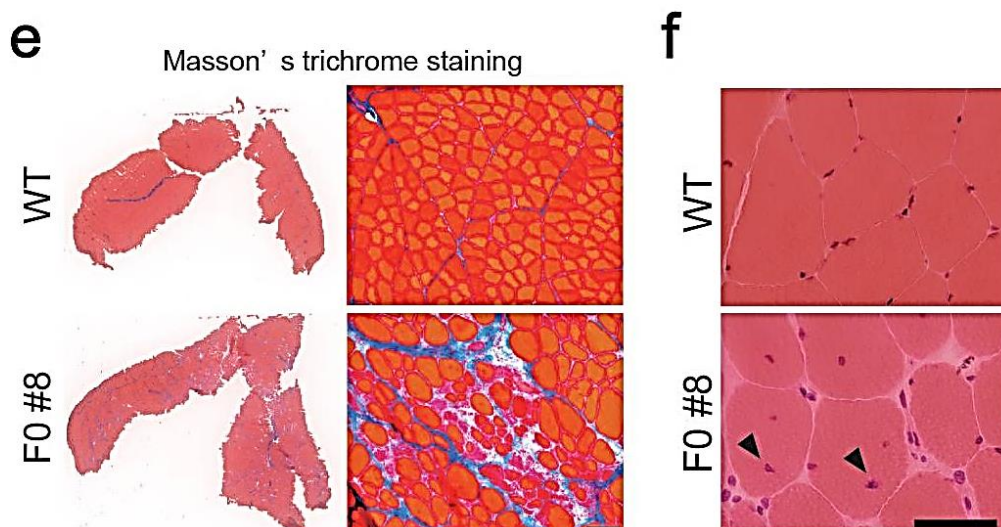


Figure 27 : Histologie du muscle tibialis anterior chez des rats *Dmd* (e) Coloration au trichrome de Masson du muscle tibialis anterior (TA), qui permet de différencier les fibres de collagène, colorées en bleu, et le tissu musculaire, chez des rats sains (WT) et mutés *Dmd* (F0#8) de 13 semaines. Echelle=100µm. (f) Coloration à l'Hématoxyline & éosine (H&E) des muscles TA chez des rats sains et mutés de 13 semaines. La chromatine des noyaux se colore en bleu foncé par l'hématoxyline et les mitochondries du cytoplasme ou les fibres de collagène du tissu conjonctif sont colorées par l'éosine. Echelle=50µm. Les myofibres avec un noyau central sont indiquées par une tête de flèche et montrent des fibres régénérées [29].

L'évolution de la maladie semble plutôt continue chez le rat *Dmd*. En effet, comparé à chez la souris *mdx* où le pic de dégénérescence des muscles se situe autour de 4 à 8 semaines d'âge, suivi d'une amélioration graduelle, chez le rat *Dmd* aucune différence significative sur l'étendue de la dégénérescence musculaire n'a été notée entre les semaines d'âge 4 et 13 [29]. L'évolution de la maladie chez le rat *Dmd* étudiée entre 3 et 7 mois, est très similaire à ce qui se passe chez l'homme, ce qui en fait un modèle intéressant pour étudier notamment les stades prénéocrotiques de la maladie et pour les études précliniques [28].

Pour conclure, les rats *Dmd mdx* constituent un nouveau modèle animal de petite taille représentatif de la myopathie de Duchenne et de Becker. Un de ses avantages par rapport au modèle murin est que son comportement est beaucoup mieux caractérisé. En effet, les rats ont une coordination motrice beaucoup plus précise et un panel comportemental plus riche, comprenant des interactions sociales plus complexes, que celles de la souris.

F. Manifestations cliniques chez le modèle chat

L'absence de dystrophine chez le chat a été appelée dystrophie musculaire hypertrophique féline (HFMD) [73]. La dystrophie musculaire a été rapportée de manière sporadique chez le chat, essentiellement des chats mâles de 3 à 6 mois, suggérant que la déficience en dystrophine est le plus souvent liée à une atteinte du chromosome X dans cette espèce également.

La manifestation clinique est assez unique chez le chat avec une hypertrophie de la langue, du cou et des muscles des épaules, des calcifications de la langue (*figure 28*), de l'hypersalivation, un mégaoesophage associé à des vomissements et des régurgitations, une démarche anormale de type « sauts de lapin », une cardiomyopathie dilatée, une hypertrophie du foie et de la rate, ainsi qu'une insuffisance rénale [31], [73], [59]. Ces chats subissent une dégénérescence musculaire puis une régénération, avec des myofibres présentant une nucléation centrale ainsi qu'une accumulation de dépôts de calcium dans les fibres musculaires sans l'apparition de fibrose (*figure 29*). Ces chats présentent une tolérance à l'exercice réduite. La dystrophie musculaire s'avère progressive et

histologiquement elle ressemble à la myopathie de Duchenne et de Becker mis à part le manque d'infiltration graisseuse et l'importante quantité de fibres musculaires hypertrophiées d'où le nom donné au modèle HFMD.



Figure 28 : La dystrophie musculaire chez le chat. Elle est due à une déficience en dystrophine et se caractérise par une hypertrophie du cou et des épaules et d'un dépôt de calcifications sur la langue, [74].

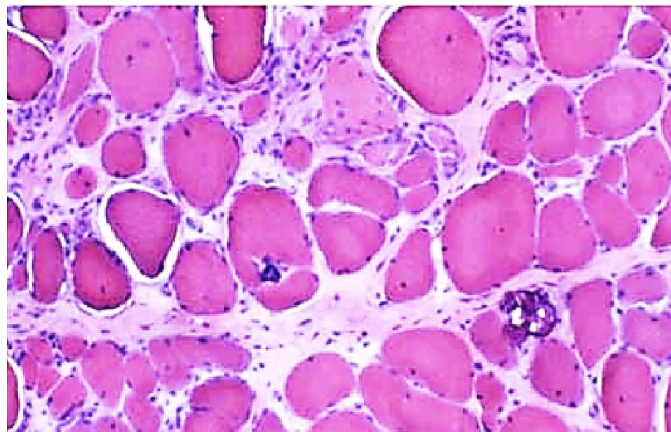


Figure 29 : Modifications histologiques typiques chez le chat déficient en dystrophine, telles que la dégénérescence et les dépôts calciques, retrouvées dans les coupes de biopsies musculaires, [74].

La minéralisation dans les muscles squelettiques des chats HFMD est similaire à celle chez le modèle canin cDMD, ce qui suggère que la dystrophine joue un rôle dans l'homéostasie du calcium, comme émis dans les hypothèses du début sur le rôle de la dystrophine. De plus, la minéralisation dans le muscle cardiaque des chats ressemble aussi à celle chez les chiens cDMD, ainsi qu'à celle chez les patients DMD, [31].

Cependant, ces chats n'ont pas été beaucoup utilisés pour l'étude des myopathies de Duchenne et de Becker, leur physiopathologie étant assez différente de celle de l'homme, comme déjà évoqué précédemment. Aucune étude thérapeutique sur des chats déficients en dystrophine n'a été rapportée. Le modèle félin reste cependant intéressant, puisqu'il permet de voir ce qu'engendre une déficience en dystrophine chez une autre espèce.

G. Manifestations cliniques chez le modèle porcin

Le modèle porcin s'avère intéressant du fait que son anatomie, sa physiologie, ainsi que sa génétique sont plus proches de celle de l'homme, que ne le sont celles des souris ou des chiens. De plus, c'est un modèle génétiquement manipulable [22].

Les porcs DMD mutés au niveau de l'exon 52, présentent une absence de dystrophine au niveau des muscles squelettiques, une augmentation du niveau des CK, des signes de dystrophie des muscles squelettiques, une mobilité altérée, une faiblesse musculaire et une espérance de vie de maximum 3 mois due à une insuffisance respiratoire.

Les porcelets affichent une mobilité réduite comparé aux contrôles sains du même âge, mais restent tout de même capables de se déplacer et de se nourrir seuls. A l'âge de 3 jours, le niveau de la créatine kinase est fortement élevé, autour de 2000 U/l contre environ 250 U/l chez les porcelets contrôles sains du même âge. Par ailleurs, des études sur la locomotion chez des porcelets DMD de 9 semaines, plus âgés, ont été effectuées, en comparaison avec des porcelets sains du même âge. Elles ont montré que la mobilité des porcs DMD était perturbée dans tous les cas, marche, trot et galop, avec des foulées raccourcies et des mouvements plus raides, ce qui est la caractéristique dominante. Associé à cette pathologie musculaire progressive, les porcs DMD affichent des difficultés caractéristiques de locomotion, notamment l'incapacité de monter sur une plateforme (*figure 30*), ce qui est comparable avec les difficultés précoces que rencontrent les patients DMD à monter des marches.

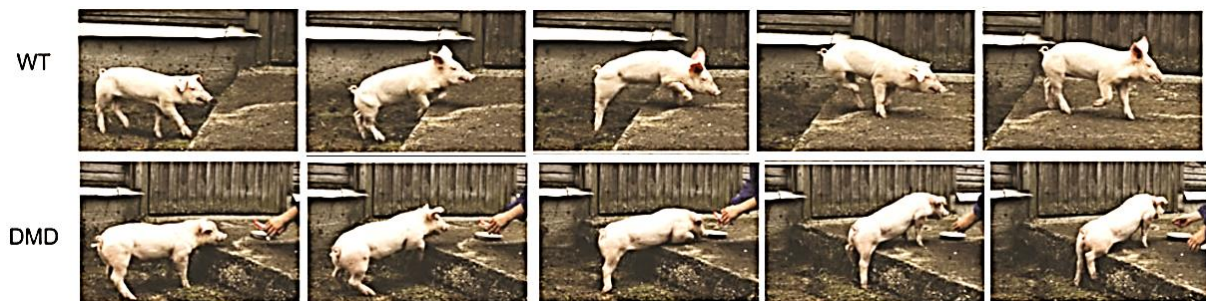


Figure 30 : Délétion ciblée de l'exon 52 sur le gène porcin DMD et ses conséquences sur la fonction musculaire. Incapacité d'un porcelet DMD de 9 semaines à monter sur une plateforme à une hauteur de 25 cm, montrant une nette faiblesse musculaire, [33].

Une relation négative entre le poids à la naissance et l'espérance de vie a été constatée. En effet, les porcelets de plus de 1200 g mourraient dans les premiers jours de vie. Les porcelets avec les poids les plus élevés (1820-1980 g) étaient ceux qui étaient le plus sévèrement atteints et ne pouvaient pas se mouvoir du tout. Les symptômes laissent supposer que la cause de leurs décès était une faiblesse musculaire et des problèmes respiratoires. Les porcelets avec un poids à la naissance plutôt bas en revanche, avaient une espérance de vie d'environ 3 mois. Les croissances intra-utérine et post-natale sembleraient donc jouer un rôle dans l'espérance de vie des porcs DMD. Il reste à savoir si cela s'applique également chez l'homme. La croissance du fœtus humain atteint un maximum entre les semaines 30 et 36, puis ralentit suite à une diminution d'apport d'énergie suffisant de la mère. Chez les porcs en revanche, les fœtus n'ont pas atteint leur maximum de croissance à la naissance et peuvent doubler leur poids de naissance lors des 7-10 premiers jours de vie, grâce à un dépôt protéique important, la croissance des tissus maigres et un dépôt important du tissu grasseux. Les bébés humains en revanche nécessitent 5 mois pour doubler leur poids de naissance. Le porc constitue donc un modèle de croissance accélérée, ce qui a tendance à aggraver le phénotype de la déficience en dystrophine. En effet, les muscles des fœtus de porc grandissent via une hypertrophie, à partir du jour 75 de la gestation environ, et comme les effets mécaniques augmentent avec le calibre de la fibre, une croissance rapide des muscles pourrait rendre les fibres des muscles des porcs DMD plus susceptibles aux dommages du sarcolemme. Le sarcolemme d'une fibre en pleine croissance ne possède donc a priori pas les mêmes propriétés que celles présentes chez un adulte. De plus, la chronologie ainsi que le type de croissance de la fibre musculaire semble modifier la sévérité du phénotype lors de déficience en dystrophine [33]. Ceci s'avère important à

prendre en compte et à explorer davantage puisque la myopathie de Duchenne et de Becker affecte de jeunes garçons en croissance. Chez le porc, la mise-bas constitue potentiellement aussi un facteur de stress mécanique sur les fibres musculaires et serait proportionnel au poids de naissance. Une troisième source de stress mécanique sur les fibres musculaires a été évoquée chez les porcelets DMD, ceux-ci se mettent à se déplacer seuls immédiatement après la naissance.

Macroscopiquement, les porcs DMD présentent des muscles squelettiques pâles de consistance diminuée avec des zones multifocales de décoloration, surtout au niveau du diaphragme et des muscles intercostaux. A l'histologie, on peut voir de nombreuses fibres musculaires hypertrophiées, des fibres qui se ramifient et qui présentent une nucléation centrale, ainsi que des amas éparpillés de fibres nécrosées à côté de fibres hypercontractées et d'amas de petites fibres en régénération. Ces lésions sont accompagnées de fibrose interstitielle et d'infiltration par des cellules inflammatoires mononucléées, rassemblant ainsi les principales caractéristiques de la maladie qu'on retrouve chez l'homme. La sévérité et l'étendue de ces lésions augmente avec l'âge des porcs DMD (*figure 31*) et sont les plus sévères dans le diaphragme, la musculature laryngée et intercostale, ainsi que dans le muscle du triceps brachial. L'examen de la musculature cardiaque n'a pas révélé d'atteinte du cœur, ce qui diffère de ce qu'on voit chez l'homme. Chez le porc DMD l'infiltration graisseuse, ainsi que la fibrose ne se font pas dans le muscle en entier, mais sont davantage localisées au niveau des foyers de nécrose.

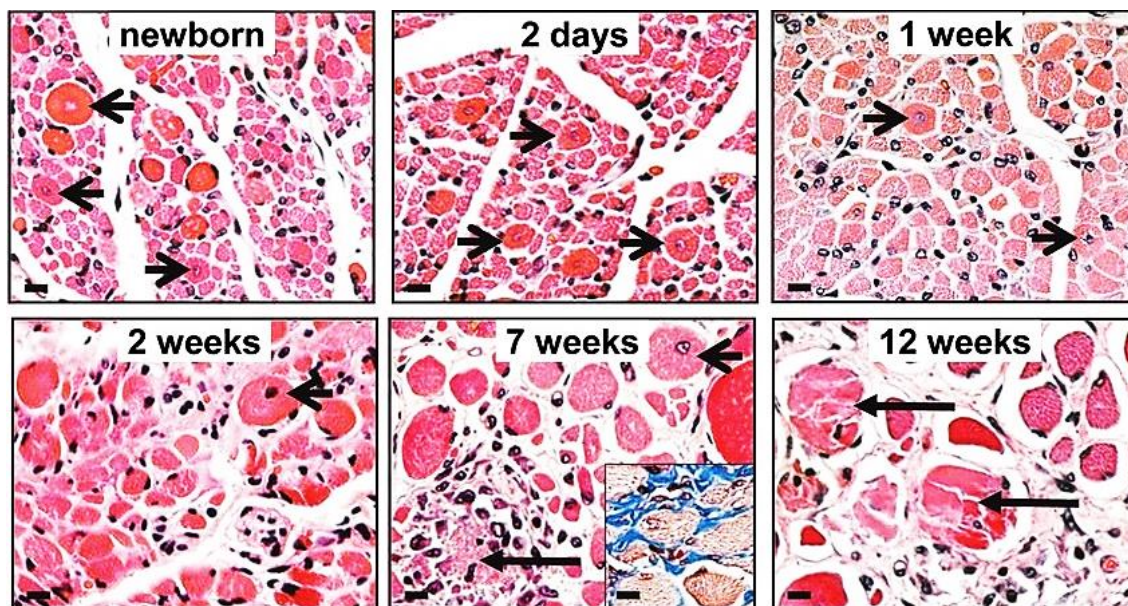


Figure 31 : Evolution des lésions des muscles squelettiques avec l'âge chez des porcs DMD. Histologie du muscle biceps fémoral. Coupes à la paraffine, coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E); mise en évidence d'une fibrose interstitielle par une coloration au colorant de Masson (en bleu). Les flèches courtes montrent les fibres larges et arrondies avec une nucléation centrale, les flèches longues montrent la nécrose des fibres musculaires. Echelle = 10 μ m. [33]

Le pourcentage de coupes transversales de fibres musculaires présentant une nucléation centrale chez des porcelets de 3 mois s'avère faible (~10%) en comparaison à celui des souris mdx du même âge (~60%) [33]. Il semblerait donc qu'il y ait un potentiel de régénération moins important chez le porc que chez la souris, expliquant le phénotype sévère et accéléré qu'on observe chez le porc DMD par rapport à la souris mdx. Cependant, le faible pourcentage de fibres musculaires avec une nucléation centrale pourrait juste être le reflet du jeune âge des porcelets utilisés pour l'étude.

Afin d'évaluer le développement de la dystrophie musculaire, qui semble se faire en accéléré chez les porcs DMD par rapport à chez l'homme, une étude du transcriptome sur tout le génome du

muscle biceps fémoral a été menée sur des porcelets DMD de 2 jours et de 3 mois d'âge en comparaison avec des porcelets sains du même âge. L'étude du transcriptome des muscles squelettiques de jeunes porcelets DMD de 2 jours d'âge et de porcs plus âgés de 3 mois a permis l'apport de nouvelles connaissances concernant les modifications précoces d'expression des gènes, associées à la déficience en dystrophine, puis secondairement les modifications qui surviennent lors du développement post-natal. En effet, chez les porcs DMD certains gènes se trouvent surexprimés et d'autres sous-exprimés, les gènes concernés changeant au cours de l'évolution de la maladie. Chez le porcelet DMD de 2 jours, les modifications dans le transcriptome sont compatibles avec les modifications notées à l'histologie lors de dystrophie musculaire avec une absence d'inflammation et de fibrose et traduisent une activité métabolique plus élevée. Chez le porc DMD de 3 mois, les modifications moléculaires sont le reflet d'une dystrophie musculaire progressive, avec des phénomènes de dégénérescence, de régénération, d'inflammation et de fibrose, accompagnés de modifications métaboliques sévères. Lorsqu'on compare ces données avec celles obtenues sur les modifications de transcriptome chez des enfants DMD et des souris mdx, les gènes davantage transcrits chez les porcs DMD de 3 mois concordent avec les gènes qu'on retrouve surexprimés chez les enfants DMD de moins de 2 ans, représentatifs de la phase préclinique de la maladie, de plus de 5 ans, lorsque la fonction musculaire est diminuée, et dans les muscles de la souris mdx à l'âge de 23 et 28 jours. Une bonne concordance a également été constatée avec les gènes sous-exprimés, qui concernent entre autres le métabolisme du glucose, la glycolyse et l'activité des facteurs de croissance. En revanche, le profil d'expression des gènes dans le biceps fémoral des porcelets DMD de 2 jours ne montre pas de signes de remodelage de la matrice extracellulaire, ni de réponse inflammatoire, ni de métabolisme énergétique diminué, qui sont observés chez la souris mdx et chez les patients DMD, même chez les patients DMD de moins de 2 ans, c'est-à-dire lors de la période présymptomatique. En effet, le transcriptome montre des similitudes avec les modifications du transcriptome qu'on a lors d'atteinte aiguë de muscles chez l'homme et lors d'une surcharge musculaire (contraction de force importante) chez la souris [33]. Cette étude montre que le modèle porcin semble adapté à l'étude des modifications génomiques et métaboliques.

Dans une étude sur un nouveau modèle porcin pour la myopathie de Becker, avec une substitution spontanée de l'exon 41 dans le gène de la dystrophine, les porcelets mâles de 8 semaines présentaient une réduction de 70% de la quantité de dystrophine dans le diaphragme, le grand psoas et le muscle longissimus lumborum, ainsi qu'une augmentation 5 fois plus importante dans le sérum du niveau de créatine kinase, comparé aux contrôles sains. A l'histologie, l'insuffisance en dystrophine au niveau du diaphragme et du longissimus montre une fibrose désorganisée, souvent associée à des infiltrations graisseuses. Ceci n'est pas retrouvé au niveau du psoas. De plus, par simple évaluation histologique il est possible de distinguer un diaphragme ou un longissimus sain d'un même muscle insuffisant en dystrophine, ce qui n'est pas le cas pour un psoas. L'insuffisance en dystrophine a donc des conséquences variables selon les muscles. Les muscles psoas et longissimus sont choisis pour les études du fait de leur mobilisation et de leur composition en fibres différentes. Le muscle psoas est généralement peu mobilisé et se compose essentiellement de fibres de type I, tandis que le longissimus est en général davantage sollicité et se compose essentiellement de fibres de type II. En effet, les muscles n'ayant pas tous la même composition en type de fibres et n'étant pas tous sollicités de la même manière, il est intéressant de savoir en quoi cela influence l'évolution de la maladie et ce que ça peut avoir comme influence vis-à-vis des différents traitements. Il s'avère que les protéines du DGC sont certes diminuées en cas de dystrophie, mais mieux conservées au niveau des fibres du psoas qu'au niveau des fibres du diaphragme ou du longissimus, où elles sont davantage sollicitées. La sollicitation moindre du psoas comparé au diaphragme et au longissimus fait aussi qu'il est mieux conservé et qu'il accumule davantage de dystrophine au niveau du sarcolemme de ses fibres. Cela laisse donc supposer que l'utilisation plus marquée d'un muscle pourrait accélérer sa dégénérescence et donc la maladie. De plus, il semblerait que les fibres musculaires de type I soient plus résistantes au manque de dystrophine que les fibres de type II, et offrent ainsi une meilleure protection face à la maladie [36].

Pour conclure, les études cliniques et pathologiques montrent que les porcs DMD développent une dystrophie musculaire progressive en accéléré comparé aux patients humains, ce qui s'avère intéressant pour étudier l'évolution de la maladie, mais également pour étudier les effets des traitements potentiels. Une hypothèse classique sur la physiopathologie de la déficience en dystrophine est que la fragilité de la membrane de la cellule musculaire constitue la pathologie initiale lors de DMD, et se trouve aggravée par le stress mécanique. En effet, le rôle du stress mécanique en début de maladie, est confirmé par le fait que le transcriptome est modifié chez les porcelets DMD de 2 jours de la même manière que lors d'une atteinte musculaire aiguë.

H. Manifestations cliniques chez les non-mammifères

1. Modèle poisson-zèbre, *Danio rerio*

Les embryons de poisson-zèbre se développent à l'extérieur, sont transparents, et sont donc accessibles aux manipulations embryologiques *in vivo*. Des recherches permanentes sont effectuées pour améliorer les modèles existants, pour pouvoir au mieux étudier la maladie de l'homme [75].

Les larves de poisson-zèbre Dmd déficientes en dystrophine sont caractérisées par une abondante nécrose des fibres musculaires, remplacées par des infiltrats mononucléés, une fibrose extensive accompagnée d'inflammation, et une plus large hétérogénéité du diamètre lors de coupes transversales des fibres musculaires. La régénération musculaire n'est pas capable de compenser l'importante perte musculaire. On peut apercevoir sur les larves vivantes Dmd le détachement des myofibres engendré par les contractions musculaires. En effet, sous une lumière polarisée, les muscles des poissons-zèbre peuvent être repérés par une zone lumineuse sur un fond sombre. Cet effet de lumière est appelé biréfringence et est le résultat de la diffraction de la lumière polarisée à travers la série des sarcomères des muscles. Les lésions musculaires se repèrent facilement par une réduction de cette biréfringence. C'est un indicateur très sensible de l'intégrité musculaire chez les larves de poisson-zèbre (*figure 32*). Cette méthode permet d'avoir des résultats reproductibles, même avec un faible nombre de larves et peut être utilisé pour caractériser les différents muscles des mutants, permettant une comparaison globale des atteintes musculaires. Les mutants Dmd peuvent être repérés très précocement et elle permet de suivre l'effet des différents traitements [76].

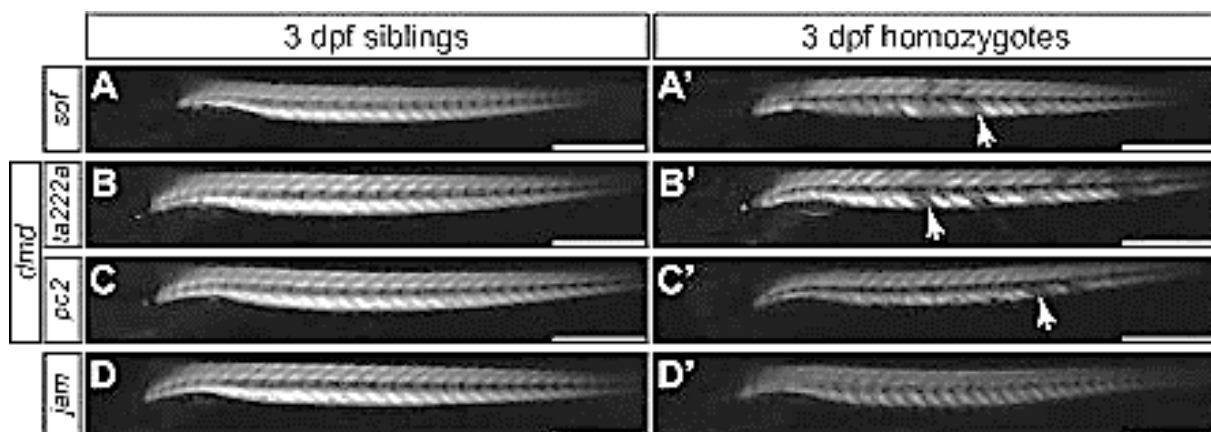


Figure 32 : Quantification de la biréfringence des muscles de poissons-zèbres mutés. (A–D) A 3 jours post fécondation la biréfringence permet de visualiser les muscles des larves. La biréfringence est diminuée au niveau des somites avec des myofibres détachées (flèches) chez les larves homozygotes (A') *sof*, (B') *dmd^{ta222a}*, (C') *dmd^{pc2}*, et (D') *jam*. [76]

Les lésions des myotomes deviennent évidentes sur les embryons des mutants Dmd homozygotes à 48 heures post-fertilisation, après une première période de développement

musculaire pendant laquelle les fibres musculaires se différencient normalement. Les lésions s'accumulent progressivement, le décès survenant après plusieurs semaines (médiane de 31 jours post-fertilisation, n=25) [39].

L'histologie montre que les fibres qui sont associées aux lésions se détachent du myosepte vertical et sont raccourcies de manière importante (*figure 33 et figure 34*). Le détachement et la rétraction des fibres musculaires ont été confirmés par la microscopie électronique, montrant des fibres avec des extrémités libres, faisant souvent moins de la moitié de leur longueur d'origine et contenant des sarcomères comprimés [39].

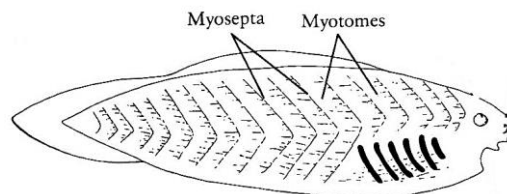


Figure 33 : Organisation de la musculature axiale chez une larve de poisson-zèbre. Vue externe. On observe la musculature segmentée en myotomes, soutenus par les myoseptes verticaux (myosepta), qui s'attachent eux-mêmes à la notochorde [77].

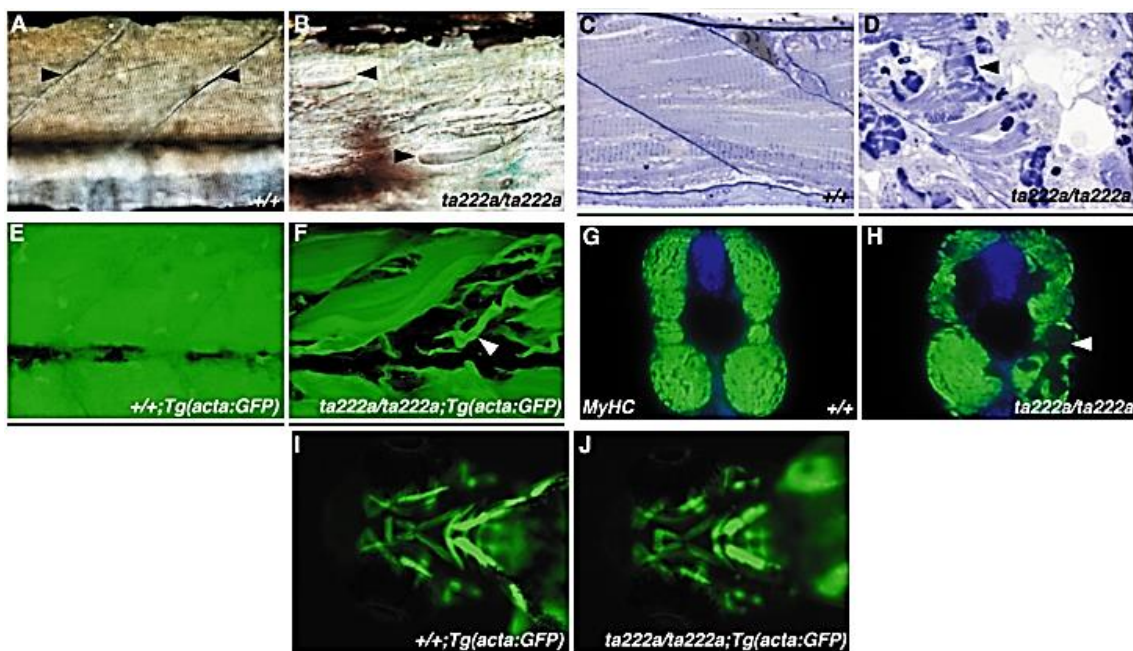


Figure 34 : Observation des muscles squelettiques chez des mutants Dmd du poisson-zèbre. Les mutants Dmd (*sapje*) développent des lésions dans les muscles squelettiques où les fibres se détachent du myosepte vertical puis se rétractent. Chez les poissons-zèbre sauvages les fibres couvrent le somite entièrement entre les myoseptes verticaux (pointe de flèche en A ; vues latérales ; 48 heures post-fertilisation), tandis que les lésions au niveau des somites des mutants Dmd sont évidentes et correspondent des espaces acellulaires (pointe de flèche en B). À l'histologie, le bleu de toluidine met en évidence des fibres détachées et rétractées chez les mutants Dmd (pointes de flèches en D, coupes parasagittales, 72 heures post-fertilisation) mais pas chez les contrôles sains (C). La reconstitution des somites en 3D en utilisant de la microscopie confocale montre une perte de fibres importante chez les mutants Dmd (pointes de flèches en F), mais pas chez les contrôles sains (E). Les anticorps anti-MyHc (en vert) montrent que la différenciation des fibres musculaires se fait de manière normale chez les poissons-zèbres sains (G) ainsi que chez les mutants Dmd (H). Cependant, des lésions associées à une perte de fibres musculaires sont observées au niveau des somites chez les mutants Dmd (pointe de flèche). L'examen de la musculature de la tête, via le gène de fluorescence (GFP), montre que ces muscles ne sont pas touchés chez le mutant Dmd (J) en comparaison avec le sujet sain (I). Les lésions sont donc limitées aux muscles des somites, [39].

Histologiquement, le modèle homozygote $dmd^{ta222a/ta222a}$ est atteint d'une dégénérescence musculaire extensive, accompagnée de fibrose, d'inflammation et d'activation de cellules souches dans le compartiment musculaire [41]. De plus, on note une variation importante dans le diamètre des myofibrilles. Une des questions soulevées, afin de déterminer si le modèle poisson-zèbre représente bien la maladie humaine, a été de savoir si avec le temps, le nombre de cellules à nucléation centrale augmentait aussi comme c'est le cas des mammifères atteints de dégénérescence musculaire. Étonnamment, avec l'évolution de la maladie, le nombre de cellules musculaires présentant une nucléation centrale diminue. Ceci s'expliquerait par des phénomènes de croissance musculaire, qui diffère entre les mammifères et les poissons. En effet, la croissance musculaire post-natale chez les mammifères se fait essentiellement par de l'hypertrophie musculaire, correspondant à une augmentation de volume et un renforcement des fibres musculaires, tandis que chez les poissons cette croissance se fait par croissance hypertrophique et hyperplasique, correspondant à l'ajout de nouvelles fibres musculaires, lors de la phase larvale. Les fibres à nucléation centrale (hyperplasie) seraient les premières fibres touchées par le phénomène dystrophique, tandis que les fibres musculaires plus matures subissent une hypertrophie massive menant à des fibres au diamètre important. La perte de nucléation centrale chez le poisson-zèbre serait essentiellement due à la perte globale de fibres musculaires lors de la myopathie [41]. L'analyse de la position centrale du noyau ne semble donc pas être un paramètre approprié pour évaluer la régénération musculaire chez les modèles poissons. Il est à noter que certaines études estiment que même chez les mammifères ce paramètre ne serait pas des plus fiables pour évaluer l'âge des fibres musculaires [41]. En effet, on peut noter que chez la souris mdx la nucléation centrale persiste assez longtemps dans les fibres régénérées et peut donc être utilisée comme marqueur de ces fibres, tandis que chez la plupart des autres modèles mammifères les noyaux migrent rapidement en périphérie des fibres [33].

Le phénotype des poissons-zèbres déficients en dystrophine dmd^{ta222a} ressemble beaucoup à celui de l'homme malade. De plus, le modèle poisson-zèbre possède un grand nombre d'avantages rendant possible la réalisation de tests pharmaceutiques *in vivo*, ainsi que des analyses en temps-réel de la perte des fibres musculaires. Ce modèle permettrait donc de faire de nouvelles découvertes indispensables pour comprendre et traiter la dystrophie musculaire déficiente en dystrophine.

2. Modèle drosophile, *Drosophila melanogaster*

La myopathie de Duchenne caractérisée par la perte de la dystrophine est bien modélisée chez la drosophile, comme vu précédemment. Visuellement, la perte de la protéine dystrophine peut être évaluée et gradée à travers la veine transversale postérieure de l'aile (*figure 35*), ce qui permet un repérage des mutants [78].

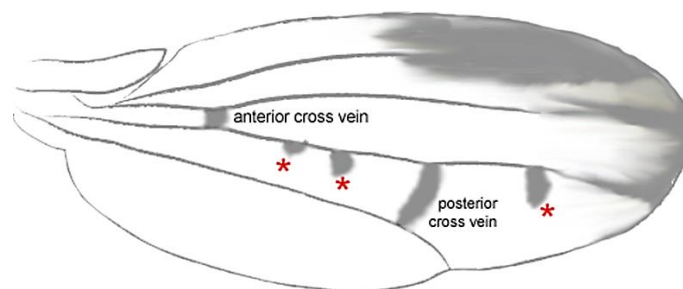


Figure 35 : Vascularisation d'une aile de drosophile. Veine transversale antérieure= anterior cross vein. Veine transversale postérieure= posterior cross vein. Les astérisques rouges représentent des veines transversales partielles, [79].

En effet, les phénotypes visibles sont plus facilement évaluables que les phénotypes fonctionnels, tels que les phénotypes de mouvements (*figure 36*).

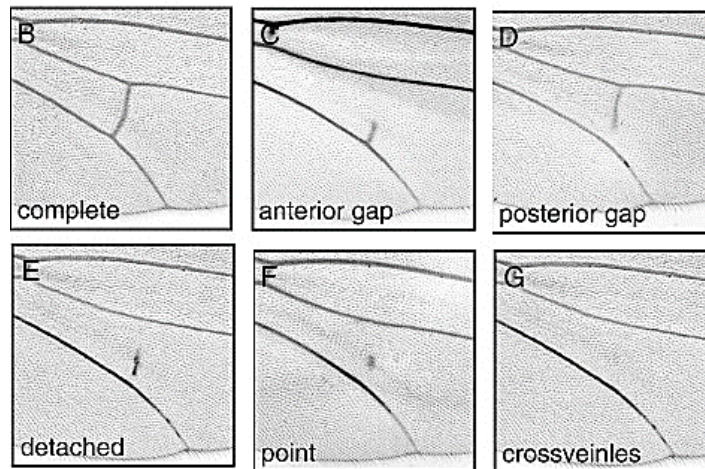


Figure 36 : Phénotypes d'ailes de drosophile obtenus par différentes mutations du gène homologue de la dystrophine. Les atteintes de la veine transversale postérieure diffèrent. Elle peut être entière (B), tronquée (C) ou (D), détachée (E), ponctiforme (F) ou absente (G). Dans aucune des mutations, la veine transversale antérieure n'a été modifiée [78].

Ce type de mutant peut servir par exemple pour étudier les différentes mutations et comprendre leur impact dans le développement de la veine transversale postérieure. En effet, des mutations dans le gène du dystroglycane engendrent également des défauts de développement de cette même veine. Cela permet aussi d'étudier l'importance de l'interaction des différentes protéines du DGC et de mieux comprendre la physiopathologie des dystrophinopathies. En effet, la morphogenèse de cette veine transversale postérieure est un système idéal pour étudier les interactions entre les voies de signalisation intracellulaire lors de son développement.

Des différences peuvent être notées chez les différents modèles de drosophile Dmd. En effet, la mutation dans le gène de la dystrophine, impactant le développement de la veine transversale postérieure, n'engendre pas d'atteinte musculaire. Même lors d'absence totale en dystrophine, ces mutants sont viables, fertiles et l'espérance de vie n'est que faiblement diminuée (environ 40 jours post-éclosion) [78]. Ce type de mutation dans le gène de la dystrophine semble donc surtout avoir un impact sur les voies de signalisation dans lesquels intervient la dystrophine. Dans d'autres études en revanche utilisant d'autres drosophiles déficientes en dystrophine montrent que ces mouches présentent des anomalies au niveau de leurs jonctions neuromusculaires, de l'intégrité musculaire, de la migration neuronale et de la polarité épithéliale [47]. Certaines études stipulent que cette atteinte est liée au fait que la mutation ne touche pas uniquement le gène de la dystrophine, mais également d'autres gènes adjacents importants [78]. En effet, dans certaines études les drosophiles mutées ne sont même pas viables, tandis que dans d'autres études utilisant d'autres mutations on n'observe que des difficultés de déplacement, associés à une dégénérescence musculaire. Une influence de la température, à laquelle les drosophiles sont gardées, pourrait également avoir une influence sur les différents phénotypes observés entre les études. En effet, une des hypothèses émise est qu'une température plus élevée pourrait accélérer la dégénérescence des muscles.

Une étude s'est donc penchée sur les fonctions mécaniques et non mécaniques de la protéine dystrophine [80]. En effet, le rôle mécanique de la dystrophine se fait par liaison à la F-actine, via l'extrémité Nt et les domaines de liaison centraux, et par liaison au dystroglycane via les domaines WW et CR, permettant ainsi une transduction de la force de l'intérieur vers l'extérieur de

la cellule, stabilisant le sarcolemme. Le rôle de signalisation se fait à travers de molécules de signalisation que rassemble la dystrophine, tels que l'oxyde nitric synthase neuronale (nNos), certains facteurs de croissance, kinases... Afin d'étudier ces deux rôles plusieurs isoformes de la dystrophine ont été utilisées, que nous détaillerons par la suite, tels que Dp71 ou Dp116, qui ne possèdent pas les domaines de liaison à l'actine et ne peuvent donc pas assurer le rôle mécanique. Cependant, leur surexpression dans les muscles squelettiques de la souris mdx n'a pas amélioré le phénotype dystrophique. Ceci suggère que le rôle mécanique de la dystrophine joue un rôle majeur lors de la dystrophie musculaire. En revanche, la surexpression de Dp116 chez des souris doublement mutées pour la dystrophine et l'utrophine augmente la masse musculaire et améliore la croissance, la mobilité et l'espérance de vie de ces souris. Le rôle de signalisation et donc non mécanique de la dystrophine semble donc malgré tout être important. En effet, Dp116 est une isoforme non musculaire de la dystrophine exprimée de manière spécifique dans les cellules de Schwann du système nerveux périphérique et qui lie le dystroglycane, la syntrophine et la dystrobrevine, mais pas l'actine. Dp116 permet donc d'évaluer les caractéristiques fonctionnelles du 'domaine de signalisation' de la dystrophine, en absence de la fonction de son 'domaine mécanique'. L'étude de ces deux rôles a également été effectuée chez les mutants Dmd de la drosophile déficients en dystrophine ($Dys^{-/-}$) au niveau du muscle cardiaque. Pour cela, chez certains mutants Dmd deux micro-dystrophines $\Delta H2-R19/\Delta CT$ et $\Delta R4-23/\Delta CT$, détaillés par la suite, qui lient la F-actine, mais ne possèdent pas le domaine Ct qui interagit avec la syntrophine et la dystrobrevine, y ont été surexprimés. Il s'agit donc de dystrophines qui devraient restaurer le rôle mécanique de la protéine. Puis, chez d'autres individus des mêmes mutants, c'est l'isoforme Dp116 qui ne peut pas restaurer le rôle mécanique de la dystrophine qui a été surexprimée. Il s'agit donc de la dystrophine qui devrait restaurer le rôle de signalisation de la protéine. A priori aucune de ces isoformes ou micro-dystrophines ne sont impliquées dans la signalisation de la nNos, puisqu'elles ne possèdent pas les unités 16 et 17 du 'rod domain' impliqué dans les interactions entre la nNos et la dystrophine. Chez ces mutants Dmd de la drosophile les fonctions supposées mécanique ($\Delta H2-R19/\Delta CT$, $\Delta R4-23/\Delta CT$) et de signalisation (Dp116) de la dystrophine améliorent la cardiomyopathie dilatée et améliorent l'organisation myofibrillaire. Ils permettent donc de significativement améliorer les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des cœurs dystrophiques. Par ailleurs, l'étude de Dp116 et de Nos chez les mutants de la drosophile $Dys^{-/-}$ montre qu'ils permettent de moduler la fonction cardiaque et confirme le rôle de signalisation de la dystrophine. Une des hypothèses émise est qu'ils régulent, même si c'est d'une manière différente, tous les deux l'homéostasie du Ca^{2+} et modulent donc la fréquence cardiaque.

Les rôles mécanique et de signalisation de la dystrophine sont donc tous les deux importants pour la fonction du muscle cardiaque.

Les analyses histologiques des muscles thoraciques majeurs montrent une dégénérescence âge-dépendante chez les mutants de la dystrophine, associée à une mobilité anormale. De plus, l'organisation cellulaire des muscles chez les mutants Dmd de la drosophile s'avère être désordonnée par rapport aux contrôles sains. De nombreuses lésions dans le tissu musculaire peuvent être mises en évidence. En effet, chez les drosophiles saines de 12 jours, les muscles indirects du vol (IFM=indirect flight muscles) présentent une structure de fibres bien organisées ayant une nucléation périphérique. Chez les mutants de la dystrophine, douze jours après l'éclosion, on constate une désorganisation des fibres musculaires, une vacuolisation, ainsi que l'absence de certains muscles. Sur une période de 9 jours, la fréquence de dégénérescence musculaire augmente six fois plus chez les mutants de la dystrophine, associé à des phénotypes beaucoup plus marqués, comparé aux contrôles sains du même âge (*figure 37*) [47].

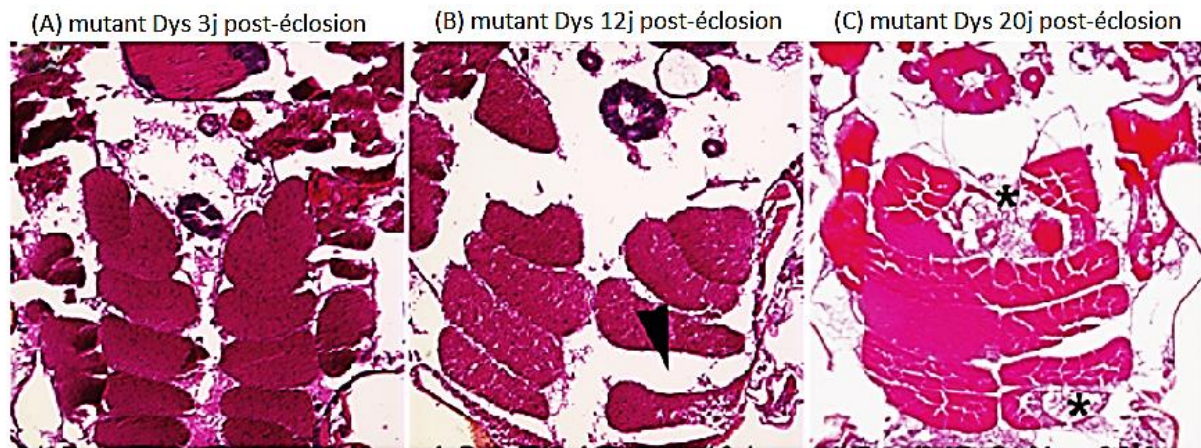


Figure 37 : Evolution de la dégénérescence musculaire avec l'âge chez des mutants *Dmd* de la drosophile (*Dys*) de 3, 12 et 20 jours. Les drosophiles contrôles possèdent une organisation normale des muscles indirects du vol et leurs fibres sont bien structurées avec une nucléation périphérique. Les mutants pour la dystrophine présentent une architecture des muscles normale 3 jours après éclosion (A), tandis qu'à 12 (B) et 20 jours (C) post-éclosion, on observe une dégénérescence musculaire, une diminution de la densité des myofibrilles, et l'absence (tête de flèche) ou la vacuolisation (astérisque) de certains muscles. Ces images montrent que la dégénération musculaire est âge-dépendante, comme chez les autres modèles DMD [47].

Le fait de supprimer dans le mésoderme des drosophiles la dystrophine, met en évidence que, c'est une protéine nécessaire pour l'entretien des muscles chez les drosophiles adultes, puisque chez les mutants une dégénérescence musculaire âge-dépendante se met en place. C'est également le cas pour les mutants du dystroglycane [47].

Pour conclure, les phénotypes des mutants de la dystrophine chez la drosophile étant très similaires à ceux des patients atteints de dystrophie musculaire suggère que l'étude de la dystrophine et du complexe de protéines qui s'y associe pourrait permettre de mieux comprendre la maladie et de trouver de nouvelles pistes thérapeutiques.

3. Modèle *Ceanorhabditis elegans*

Les muscles de *C. elegans* ont une structure sarcomérique et une composition en protéines très proche de ceux des muscles striés des mammifères, mis à part deux aspects particuliers. Les cellules musculaires ne fusionnent pas et ne sont pas capables de se régénérer [81]. Les cellules musculaires de *C. elegans* diffèrent aussi de ceux des mammifères par le fait qu'elles ne contiennent pas de cellules satellites [50]. Donc lors d'endommagement de cellules musculaires, celles-ci ne sont pas remplacées par de nouvelles cellules.

Les vers porteurs d'une mutation non-sens sur leur gène de la dystrophine (*dys-1*) présentent une locomotion hyperactive, des mouvements amplifiés de la tête et une tendance à l'hypercontraction. Ils ne présentent en revanche pas de signes de dégénérescence musculaire [50], [49]. En effet, la robustesse de *C. elegans* limite parfois son utilisation dans les études sur les atteintes neuromusculaires, car beaucoup de modèles de maladies humaines n'affichent que des phénotypes atténués lorsqu'ils rampent [82]. Or, dans leur habitat naturel, les vers *C. elegans* passent beaucoup de temps à creuser dans le sol. La plupart des études n'observent que les mouvements de *C. elegans* quand il creuse. Une étude a donc développé une expérience où le vers est obligé de creuser à travers des substances de densités différentes, afin de favoriser des puissances de contractions musculaires plus élevées [82]. Il s'avère que le fait de creuser dans des substances de densités différentes implique plusieurs cinématiques. Les mutants *dys-1* rampent

normalement, mais présentent de sérieuses difficultés pour creuser. De plus, la dégénérescence musculaire y est accélérée et exacerbée comparé aux contrôles sains.

C'est en associant la mutation de la dystrophine *dys-1* à celui d'un autre gène MyoD (gène *h1h-1*), nécessaire pour une myogenèse correcte comme vu précédemment, qu'on observe une atteinte progressive de la locomotion lorsqu'ils rampent, due à une dégénérescence extensive des muscles de la paroi du corps [50]. Les double mutants *dys-1/h1h-1* présentent une atteinte progressive de la locomotion lorsqu'ils rampent aux stades adultes. A 7 jours, environ 2 jours après l'atteinte du stade adulte, 100% des animaux présentent des troubles de la coordination sévères. En effet, ces animaux se déplacent lentement et laissent derrière eux des traces irrégulières. Les mutants *dys-1/h1h-1* se déplacent bien au cours des premiers stades de développement, jusqu'au stade larval 4 (L4), tandis que les adultes souffrent de paralysie, qui pourrait être due à l'activation du système ubiquitine/protéasome dans les muscles, qui engendre la dégradation de protéines et notamment de la dystrophine [49], hypothèse intéressante pour l'étude de la maladie chez l'homme. Par ailleurs, les doubles mutants *dys-1/h1h-1* ne peuvent pas pondre d'œufs, ce qui n'a pas été noté chez les mutants simples *dys-1*. Il a été ensuite vérifié que c'était bien dû à une synergie des deux mutations à l'aide d'un transgène qui permet d'annuler une des mutations. Cela a permis de restaurer la locomotion et la ponte d'œuf [50]. Un tel transgène s'avère intéressant dans la recherche de traitements pouvant supprimer une mutation.

La musculature des mutants a été étudiée en la colorant avec la phalloïdine, un colorant marquant les fibres d'actine (F-actine) et qui permet de mettre en évidence l'organisation sarcomérique des muscles striés de la paroi du corps de *C. elegans*. La coloration à la phalloïdine se fait de manière uniforme sur toutes les 95 cellules musculaires du corps de *C. elegans* sain, tandis que chez les doubles mutants *dys-1/h1h-1*, un nombre variable de cellules musculaires ne présentent pas cette coloration de l'actine F (*figure 38*). Environ 12,4% ($\pm 0.3\%$) des muscles n'étaient pas colorés [50].

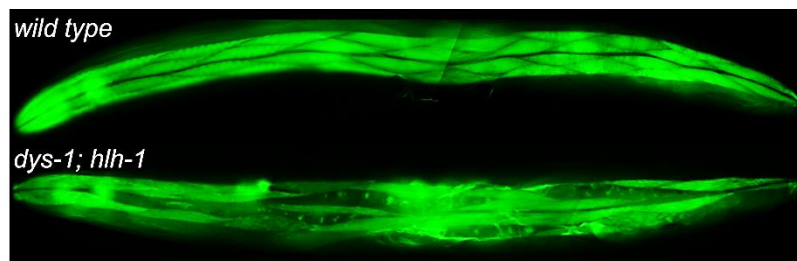


Figure 38 : Coloration à la phalloïdine des filaments d'actine chez un individu *C. elegans* sain (en haut, *wild type*) et chez un double mutant *dys-1/h1h-1* (en bas). Tous les animaux étaient maintenus à 15°C et étaient adultes (2^e jour). Vue dorsale. Echelle= 50 μ m, [49].

Chez les mutants simples de la dystrophine, la plupart des muscles de la paroi du corps ont un profil normal de cellules striées avec une organisation régulière en forme de diamant. Tandis que chez les doubles mutants adultes *dys-1/h1h-1*, les cellules de la paroi musculaire sont sévèrement désorganisées avec plus de 50% des cellules qui présentent un profil de fibres d'actine anormal ou absent (*figure 39*). C'est l'altération des muscles qui fait que les doubles mutants présentent davantage de difficultés locomotrices. L'altération du profil musculaire de l'actine F est moins fréquente chez les stades larvaires, ce qui correspond à une atteinte progressive de la locomotion.

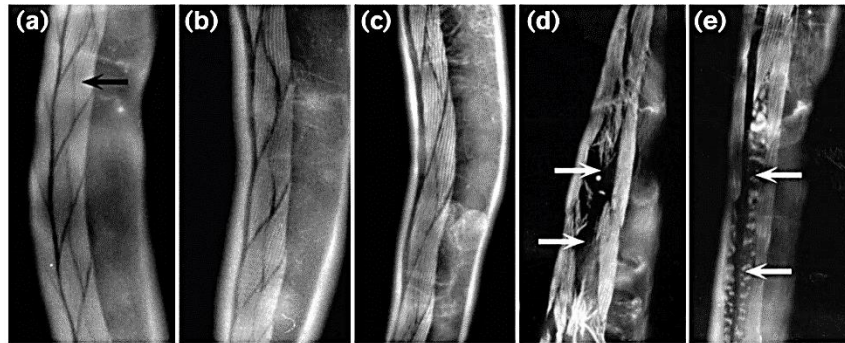


Figure 39 : Visualisation des muscles de la paroi du corps de *C. elegans*. En (a,b,c), les cellules musculaires sont organisées de manière régulière et apparaissent comme des structures striées en forme de diamant (flèche noire). Cet arrangement est sévèrement perturbé chez les doubles mutants (d,e) *dys-1/hlh-1*, avec de nombreuses cellules manquantes ou présentant un profil anormal (flèches blanches), [50].

La perte progressive de cellules musculaires chez *C. elegans*, sans qu'elles se régénèrent, entraîne une modification de la distribution des noyaux. Dans la partie centrale du corps du ver, on observe une disparition des noyaux des cellules qui perdent la coloration de l'actine. Les noyaux perdent leur forme et la taille du nucléole augmente jusqu'à atteindre la taille du noyau en soi. En revanche, aux extrémités antérieure et postérieure du corps (*figure 40*), les cellules musculaires ne semblent pas atteintes et ne disparaissent qu'occasionnellement [49]. La dégénérescence musculaire touche les cellules musculaires les plus sollicitées lors de la locomotion, elle dépend de l'exercice fourni et de la force utilisée [83].

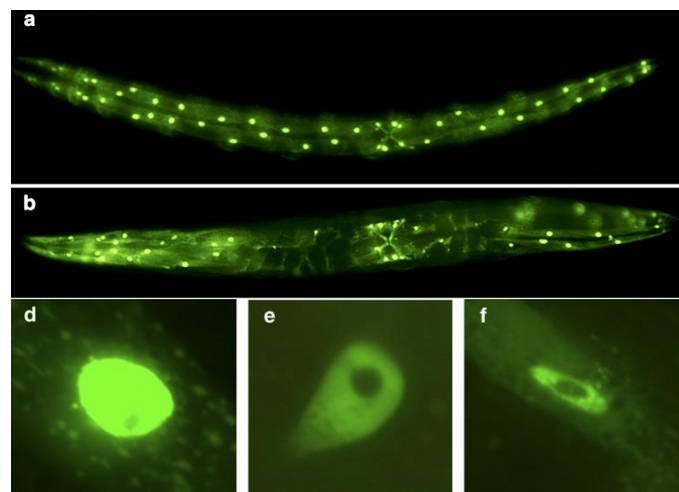


Figure 40 : Dégradation des noyaux des cellules musculaires chez les vers déficients en dystrophine. L'expression du gène GFP localisé dans les noyaux a été étudiée. Une vue globale de l'expression du GFP chez *C. elegans* dans les noyaux des cellules musculaires de la paroi (a) chez des individus sains, (b) chez des doubles mutants *dys-1/hlh-1*, où l'on note la disparition des noyaux au niveau de la partie centrale du corps du ver. (d-f) Vue agrandie des noyaux des muscles : (d) individu sain, (e, f) double mutants *dys-1/hlh-1*. On note des modifications dans la forme du noyau et une augmentation de la taille du nucléole. Tous les animaux étaient maintenus à 15°C et avaient atteint leur 2^e jour adulte [49].

Dans la région centrale du corps du ver, de nombreuses cellules accumulent des vésicules intracellulaires de type lysosomes (*figure 41*), qui sont signes de nécrose. De plus, leurs membranes se détachent de celles des cellules voisines [49].

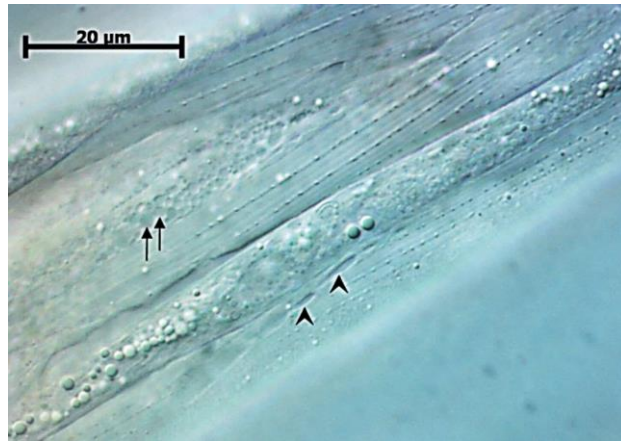


Figure 41 : La région centrale du corps de *C. elegans* adulte de 2 jours double mutant *dys-1/hlh-1*, observée au microscope à contraste interférentiel (Nomarski picture). De nombreuses cellules accumulent des vésicules intracellulaires typiques d'une désintégration lysosomiale observée lors de nécrose (flèches). Les membranes de cellules adjacentes se détachent (pointes de flèches). Echelle= 20 μ m, [49].

La dégénérescence musculaire liée à la déficience en dystrophine chez *C. elegans* ne représente qu'une partie des aspects cliniques et de la complexité physiologique observée chez les humains DMD, mais permet néanmoins l'étude d'un grand nombre de caractéristiques de la maladie, permettant d'avancer dans la compréhension de la physiopathologie de la myopathie de Duchenne et de Becker et la recherche de traitements adéquats.

IV. D'autres organes atteints lors de myopathie de Duchenne et de Becker

Bien que les myopathies de Duchenne et de Becker soient le plus souvent considérées comme des maladies des muscles squelettiques, elles affectent également de multiples autres organes. En effet, les complications cardiaques et les atteintes du système nerveux central entre autres ont également des conséquences importantes sur la santé des patients DMD.

A. L'atteinte cardiaque

Dans les fibres musculaires du cœur, la dystrophine est présente au niveau du sarcolemme, mais aussi au niveau des tubules T, impliqués dans la conduction des potentiels d'action, mais pas dans la force de contraction. L'absence de dystrophine entraîne des arythmies et des irrégularités de conduction. C'est en partie dû à de la fibrose cardiaque, qui n'est pas uniforme dans le myocarde et qu'on peut corrélérer aux irrégularités de l'ECG et aux dysfonctionnements ventriculaires qu'on observe [84]. Ces irrégularités évoluent au cours de la maladie, bien que la plupart des symptômes soient subcliniques ou plus ou moins masqués par la faible activité physique des malades. Cependant, les lésions cardiaques sont évidentes dans un tiers des cas à l'âge de 14 ans, et chez 100% des cas de plus de 18 ans. Chez la souris *mdx*, contrairement à la dégénérescence des muscles squelettiques, qui est limitée, on observe des lésions du myocarde. A l'âge de 3 mois, la souris *mdx* présente un métabolisme modifié, associé à une augmentation de la consommation d'oxygène, un travail cardiaque moins efficace et une fragilité des membranes cellulaires augmentée. A 6 mois, le ratio poids du cœur/ poids corporel montre une hypertrophie cardiaque chez la souris *mdx*, comparé aux souris saines contrôles, ce qui indique un dysfonctionnement cardiaque chez les souris âgées.

Ces modifications se voient également à l'ECG. A partir de 9 mois, la fibrose est évidente à l'histologie et à partir de 15 mois, de la fibrose interstitielle est visible dans le myocarde, l'endocarde et l'épicarde de la paroi des ventricules et le septum interventriculaire. Pour l'étude de l'atteinte des muscles cardiaques le modèle mdx constitue un très bon modèle, plus que pour les muscles squelettiques [12].

On retrouve des lésions similaires de dégénérescence des fibres musculaires cardiaques, d'infiltration par des cellules inflammatoires et parfois d'hypertrophie du ventricule droit chez les rats Dmd (figure 42). Les lésions dégénératives du cœur paraissent plus sévères chez le modèle rat Dmd que chez la souris mdx [29].

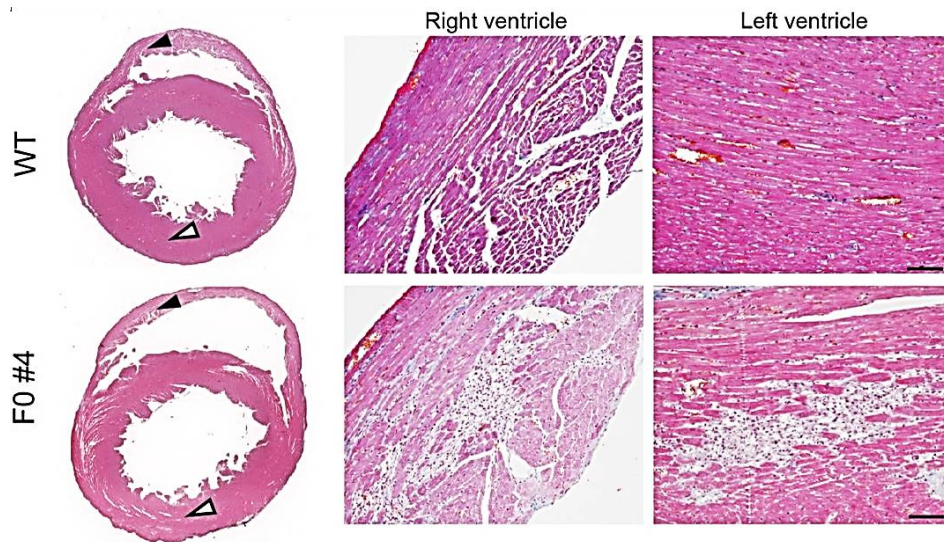


Figure 42 : Coloration au trichrome de Masson de cœurs de rats sains et mutés Dmd (FO) de 13 semaines d'âge. Echelle=100 μ m. Les pointes de flèches noires et blanches indiquent les ventricules droit et gauche, respectivement. Il semblerait qu'il y ait un élargissement du ventricule droit, même si les résultats ne s'avèrent pas statistiquement significatifs. Une dégénérescence des fibres musculaires, une fibrose et infiltration par des cellules inflammatoires est notée au niveau des deux ventricules, [29].

A l'histologie du tissu cardiaque chez le porc Dmd, le ventricule gauche montre des signes évidents de dégénérescence myofibrillaire et de nécrose. Les fibres myocardiques présentent une perte des stries transversales, des nucléi picnotiques et une agrégation de lymphocytes associée (figure 43) [35].

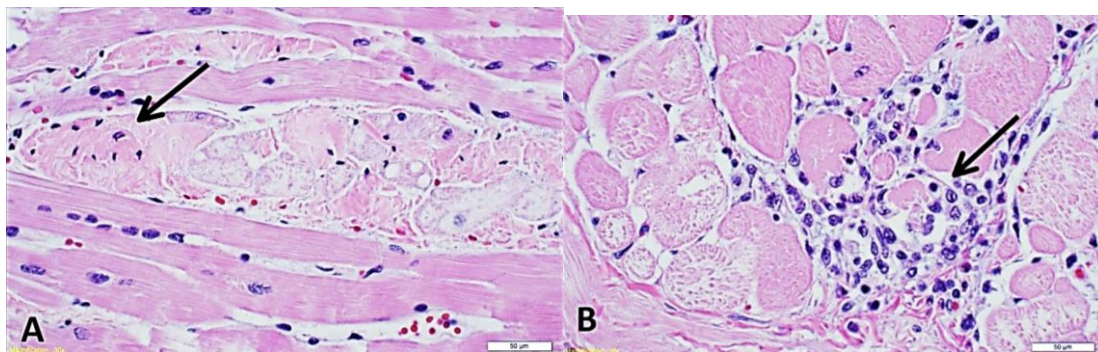


Figure 43 : Histologie du ventricule cardiaque gauche d'un porc dmd. Les coupes de cœur d'un porc mâle dmd de 1 an montrent une dégénérescence des fibres musculaires (grossissement=30X ; échelle=50 μ m). (A) Fragmentation des myocytes, noyaux picnotiques (flèche) et perte de la striation transverse. (B) Agrégation de lymphocytes et perte de myofibres (flèche), [35].

La cardiomyopathie dilatée est donc la manifestation cardiaque principale lors de myopathie de Duchenne. L'atteinte cardiaque est retrouvée dans de nombreux modèles animaux, notamment de nombreux modèles souris dko, doublement mutés. Le type de mutation du gène de la dystrophine peut influencer le phénotype de l'atteinte cardiaque. Une cardiomyopathie qui se développe sans atteinte des muscles squelettiques est fréquemment causé par une mutation faux-sens dans le gène de la dystrophine. Ce sont les souris mdx femelles âgées qui constituent de loin les meilleurs modèles dans l'étude de la cardiomyopathie dilatée lors de myopathie de Duchenne, car elles sont phénotypiquement identiques à ceux des humains atteints par cette forme de la maladie. En effet, les souris mdx mâles ont plus tendance à avoir des cardiomyopathies hypertrophiques [1].

Les patients atteints de myopathie de Duchenne ou de Becker développent en général une cardiomyopathie dilatée indépendamment du degré de l'atteinte des muscles squelettiques. Le taux de CK (créatine phosphokinase) circulants est plus élevé que la normale, sûrement lié à l'augmentation de la perméabilité membranaire, l'absence de dystrophine faisant que les membranes des fibres musculaires sont plus susceptibles de se déchirer sous la force des contractions musculaires [85]. Les dystrophinopathies peuvent également se manifester par des arythmies ou des arrêts cardio-respiratoires suite à une anesthésie à l'isoflurane. Mais les raisons physiopathologiques des arrêts cardiaques induits par l'anesthésie chez les patients atteints de dystrophinopathies restent inconnues. On suppose que la rhabdomyolyse des fibres musculaires cardiaques entraîne une fuite dans le sang de calcium et de potassium, entraînant une hyperkaliémie pouvant entraîner l'arrêt du cœur [35]. Chez des chats déficients en dystrophine, il a été rapporté que l'anesthésie à l'isoflurane ou un stress induisait de la rhabdomyolyse, de l'hyperkaliémie, puis la mort [86]. En effet, la rhabdomyolyse et le syndrome de l'hyperthermie maligne sont de possibles complications chez les patients DMD suite à une anesthésie ou suite à l'utilisation de myorelaxants. Etablir une réelle différence entre la rhabdomyolyse et le syndrome de l'hyperthermie maligne s'avère difficile. Cela constitue un danger notamment pour de jeunes enfants dont le diagnostic de la maladie n'est pas encore posé et pour lesquels une anesthésie présente un risque élevé. Il semblerait que chez les malades DMD, le sarcolemme possède une sensibilité excessive aux agents anesthésiques volatils, au stress ou à une activité musculaire intensive, ce qui entraîne la libération des composants intracellulaires dans l'espace extracellulaire, entraînant un déséquilibre métabolique souvent fatal.

Chez le chien cDMD notamment, des études électrocardiographiques (ECG), échocardiographiques, d'angiographie, des IRM cardiaques et des études de pathologie cardiaque ont été effectuées [2]. Des changements analogues lors d'études prospectives ECG et échocardiographiques chez des chiens cDMD sur des périodes de 3, 6 et 12 mois ont montré que ces examens peuvent être utilisés dans les essais précliniques, pour l'évaluation objective de l'atteinte cardiaque [87]. C'est l'augmentation du ratio Q/R sur l'ECG qui a été la modification la plus significative trouvée chez les chiens cDMD. La manifestation clinique chez les chiens cDMD et les humains DMD sont similaires, avec des ondes Q larges sur l'ECG et de la fibrose de la paroi du ventricule gauche. Très peu de connaissances existent sur les modifications structurales sous-jacentes aux modifications observées à l'ECG chez les patients DMD. Plusieurs hypothèses ont été émises comme la perte de myofilaments, une ischémie localisée, une dégénérescence des myofibres et une fibrose du myocarde.

Il a été mis en évidence que les ondes Q larges précédaient le développement de fibrose observé à l'histopathologie. Par ailleurs, l'expression de l'utrophine était fortement augmentée dans les fibres de Purkinje aux premiers stades de la maladie. Cependant, à l'âge de 4 mois, quand la dégénérescence vacuolaire se voit, l'expression de l'utrophine est diminuée. L'hypothèse est donc que c'est la dégénérescence sélective des fibres de Purkinje qui engendre les ondes Q larges sur l'ECG et qui entraîne les arythmies fatales qu'on observe lors de dystrophinopathie [59].

Mis à part le lien entre la dégénérescence vacuolaire des fibres de Purkinje et les grandes ondes Q, aucune autre hypothèse n'a été confirmée expérimentalement. Il reste incertain si l'utilisation de l'ECG peut être utilisée pour monitorer l'effet d'interventions thérapeutiques chez les malades DMD et chez les chiens cDMD.

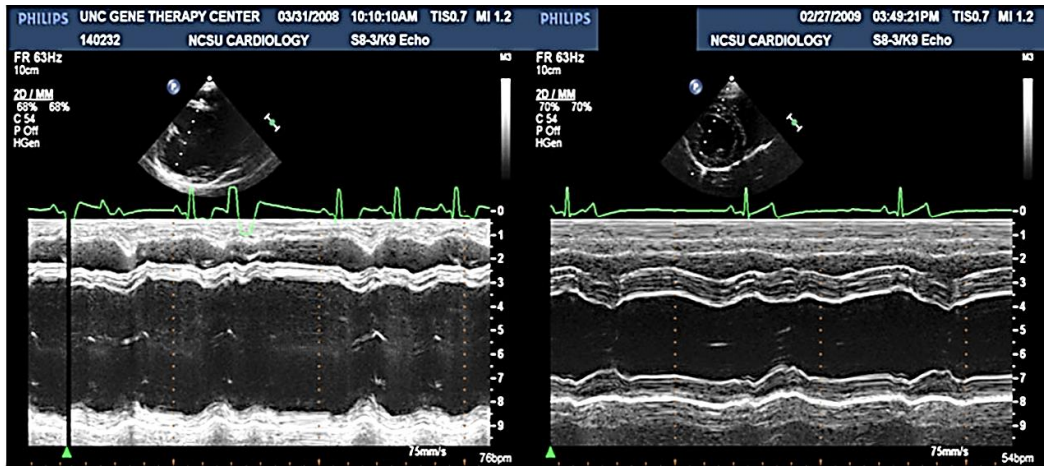


Figure 44 : Echographies cardiaques chez des chiens cDMD (GRMD). Echocardiogramme (ECG) chez un chien GRMD mâle de 4 ans (à gauche), qui montre une réduction marquée de la contractilité du ventricule en systole en comparaison avec un chien sain (à droite), [2].

Le profil échocardiographique a été établi pour la cardiomyopathie de Duchenne (*figure 44*). Les changements typiques sont une mobilité locale des parois anormale, des lésions hyperéchogènes, une dilatation des cavités du cœur et un dysfonctionnement systole/diastole. On suppose qu’au cours de la progression de la maladie, on a d’abord un stade hypertrophique puis une dilatation des ventricules [87].

L’échocardiographie chez le modèle rat *Dmd* montre un remodelage concentrique et une altération de la fonction diastolique. Toutes les modifications de la morphologie cardiaque sont représentatives d’une cardiomyopathie dilatée progressive, associée histologiquement à des modifications nécrotiques et fibrotiques. Les études montrent la présence d’un remodelage concentrique du cœur à 3 mois des rats *Dmd*. Aucune modification dans les fonctions systoliques, tels que la fraction d’éjection, n’a été observée, tandis que plusieurs paramètres de la fonction diastolique étaient altérés [28].

L’atteinte cardiaque est à prendre au sérieux et à rechercher en cas de myopathie de Duchenne et de Becker. Davantage d’études via les modèles animaux devraient permettre de mieux comprendre les effets de cette atteinte sur l’évolution du phénotype de la maladie. De plus, au niveau du cœur le besoin d’une stabilité du sarcolemme est d’autant plus important dans le myocarde du fait de l’activité de pompe permanente du cœur.

B. L’atteinte du système nerveux central et périphérique

Chez environ un tiers des individus atteints de myopathie de Duchenne on note des déficiences cognitives, ainsi que d’autres symptômes nerveux centraux [1], [88]. Bien que largement sous-diagnostiqué, on note très souvent une atteinte de l’humeur, tels que dépression et anxiété, chez les patients DMD avec un niveau faible mais persistant de dépression [12]. L’atteinte cognitive est considérée comme non-évolutive au cours de la maladie, tandis que les garçons DMD semblent plus susceptibles aux états dépressifs avec l’évolution de la maladie [89]. Toutes les isoformes de la dystrophine ont été retrouvées dans le système nerveux, mais seulement *Dp140* et *Dp71* sont impliquées chez les humains DMD présentant des anomalies neurologiques. On retrouve ces deux isoformes de la dystrophine en grande concentration dans les régions impliquées lors de myopathie de Duchenne et de Becker. La dystrophine est exprimée dans le cortex cérébral, le cervelet et dans les régions CA1–CA3 de l’hippocampe [89]. En effet, la souris *mdx* présente une moins bonne

coordination motrice possiblement due à un dysfonctionnement cérébelleux, ou à une faiblesse musculaire. Le comportement de défense anormal des souris mdx suggère une atteinte de l'amygdale, aussi conforté chez les patients DMD qui ont des difficultés à reconnaître les expressions de la face. Certains déficits de la mémoire que présentent les souris mdx indiquent aussi un dysfonctionnement de l'hippocampe. En effet, les patients DMD présentent des déficits dans tous les types de mémoires, laissant là aussi supposer que la dystrophine joue un rôle la consolidation de la mémoire [90].

Parmi tous les modèles de la myopathie de Duchenne, seulement les modèles souris mdx3cv et mdx β geo n'expriment pas les protéines Dp140 et Dp71. Étonnamment les fonctions neurocognitives de la souris mdx3cv ne sont que faiblement modifiées par rapport à ceux du modèle mdx. Un modèle souris spécifique, délété en Dp71 (Dp71 KO) a donc été créé et a généré des souris présentant davantage de difficultés à l'apprentissage que les souris mdx classiques [1]. Cependant, il y a peu d'études sur le profil comportemental des souris dystrophiques, bien que des études plus récentes ont montré que la souris mdx présentait un comportement dépressif plus marqué que les souris contrôles du même âge, ainsi que des comportements anxieux plus marqués [91], même si toutes les évaluations comportementales n'ont pas mis en évidence de signes d'anxiété chez ces animaux. La question qui se pose dans ce type d'étude comportementale est dans quelle mesure les atteintes motrices impactent-elles la fonction d'exploration de ces individus. En effet, lors d'études comportementales, qui sont dépendantes de la locomotion pour le modèle souris mdx, il est essentiel de prendre en compte l'âge des individus, même si les souris n'ont de déficiences motrices qu'à partir de 6 mois environ [12].

Il est très probable qu'aucun des modèles souris actuellement existant ne puisse complètement reproduire les anomalies neurocognitives que présentent les patients DMD [1]. Malheureusement, la compréhension de l'étiologie des symptômes dépressifs chez les patients DMD est fortement négligée du fait que les symptômes les plus sévères lors de myopathie dystrophique sont une inflammation progressive des tissus musculaires et une perte de leur fonction. La plupart des études portant sur l'atteinte neurocognitive ont utilisé les souris mdx pour étudier les conséquences moléculaires et cellulaires de la déficience en dystrophine dans le cerveau. Ces études ont montré des anomalies au niveau de l'hippocampe, ainsi que dans plusieurs autres régions du cerveau. Il y a quelques d'études sur le comportement des souris mdx, mais les informations manquent encore. Plus particulièrement, c'est l'aspect émotionnel qui a peu été étudié chez les souris mdx. Une étude non publiée de Sekiguchi, suggère une réaction plus marquée chez des souris mdx pour des stimuli désagréables par rapport à des contrôles sains [89].

Des études détaillées chez la drosophile ont mis en évidence que le complexe dystrophine-dystroglycane était nécessaire dans les neurones et dans les cellules gliales pour une croissance normale de l'axone (*figure 45*). Il reste à déterminer si comme chez la drosophile, le complexe dystrophine-dystroglycane est nécessaire chez les vertébrés pour une croissance correcte et ciblée des axones des neurones et des cellules gliales [47]. Chez la souris mdx une délétion ciblée des dystroglycanes dans le cerveau entraîne des malformations du cerveau semblable à ce qui est retrouvé lors de dystrophie musculaire. En effet, le complexe dystroglycane semble être un facteur clé pour fixer la dystrophine aux synapses GABAergiques. La dystrophine semble jouer un rôle dans la maturation et la stabilisation des synapses GABAergiques [89]. En effet, là encore comme vu précédemment chez le modèle drosophile, il a été montré qu'au niveau du système nerveux de la souris mdx le rôle non-mécanique de signalisation de la dystrophine joue aussi un rôle important. La dystrophine et le DGC jouent un rôle de plateforme pour les voies de signalisation variées [90].

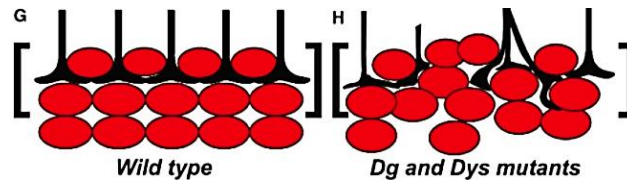


Figure 45 : Rôle du complexe dystrophine-dystroglycane dans le cerveau de la drosophile et impact du manque de dystrophine. (G) Chez la drosophile saine, on observe dans le cerveau une organisation stéréotypée, avec chaque axone se terminant entre des cellules gliales, ce qui donne un profil régulier axone/cellule gliale/axone. (H) Chez les mutants de la dystrophine, on observe une désorganisation de cette structure. Les cellules gliales sont réparties de manière irrégulière et les axones des photorécepteurs forment des paquets, ce qui entraîne des lacunes et d'autres régions denses dans la lamina, [47].

Une étude ciblée sur le rôle de la dystrophine au niveau des jonctions neuromusculaires chez la drosophile a montré que les déficiences neuronales observées pourraient être dues à des défauts de polarité lors de la croissance des axones [92]. La croissance des axones des photorécepteurs chez les drosophiles, constitue un excellent système pour l'étude génétique de la croissance neuronale ciblée. En effet, lors de la formation du système nerveux, les jeunes neurones envoient des axones afin de trouver leurs cibles. Chaque axone se dirige selon un cône de croissance qui est influencé par des signaux extracellulaires et choisit entre différents substrats extracellulaires pour permettre la migration de l'axone. La dystrophine associée à son complexe de protéines permettrait une bonne croissance ciblée des axones et une organisation correcte des différentes cellules nerveuses entre elles. Le nombre de neurones corticospinaux et leur densité, mesurés par injection d'un marqueur chez des souris mdx, est également diminué par rapport aux souris saines contrôles. On note également une modification de la perméabilité de la barrière hémato-méningée, entraînant une modification de l'environnement des neurones, avec notamment une augmentation de la concentration en K^+ [89].

Cependant, il n'est pas clair pour l'instant si les modifications observées ont un impact suffisamment important pour modifier le comportement, notamment chez la souris mdx. Il n'est pas clair si la réduction du nombre d'amas de récepteurs $GABA_A$ entraîne des modifications de comportement chez la souris ou non.

C. Atteinte des muscles lisses

1. Les vaisseaux

La dystrophine est normalement retrouvée dans la tunique moyenne des vaisseaux sanguins, mais est absente chez la souris mdx. Un manque de dystrophine peut entraîner une ischémie fonctionnelle, entraînant ou exacerbant les dommages causés aux fibres musculaires par un flux sanguin anormal. Sachant que la signalisation par l'oxyde nitrique (NO) est médiée par le complexe de protéines associées à la dystrophine [93], et que cette signalisation joue un rôle vital dans la santé vasculaire, la perte de dystrophine dans les muscles lisses des vaisseaux peut entraîner une moindre résistance des vaisseaux aux contraintes mécaniques ainsi qu'un tonus basal anormal des muscles lisses des vaisseaux. Cependant, c'est bien le manque de dystrophine qui entraîne un stress métabolique et mécanique qui explique la mort cellulaire en plus de l'ischémie. Là encore cela montre deux rôles de la dystrophine, mécaniques et non-mécaniques. Si l'on compare l'absence de dystrophine à des pathologies où l'on a uniquement un manque de nNOS et donc d'oxyde nitrique, le phénotype est beaucoup moins sévère [12].

2. Le tube digestif

Bien qu'exprimé en quantités moins importantes que dans les muscles squelettiques et cardiaques, la dystrophine est également retrouvée dans les cellules des muscles lisses du système gastro-intestinal. En effet, chez le poisson-zèbre *Dmd* on a noté la présence de dystrophine, d'utrophine et de sarcoglycane dans le tube digestif distal, ce qui laisse supposer que ces protéines font partie du complexe DGC des muscles lisses de l'intestin [53]. Les symptômes de la dystrophinopathie incluent une hypo-motilité du tube digestif, une dilatation gastrique aiguë et des pseudo-obstructions qui peuvent être fatales. De plus, on observe chez les patients DMD des vomissements, des diverticules du colon et des anomalies de fonctionnement, avec un temps de vidange gastrique augmenté. Même si certains symptômes tels que la constipation ou un temps de transit dans le colon diminué peuvent être attribués à l'immobilité des patients et à des muscles abdominaux affaiblis, une certaine proportion des patients DMD ont un dysfonctionnement gastro-intestinal indépendamment du fait qu'ils soient en chaise roulante ou pas. Il semblerait qu'il n'y ait pas de lien avec la sévérité d'atteinte des muscles squelettiques. De plus, l'atteinte des muscles lisses est décrite lors d'autopsies d'estomacs de patients DMD [12].

Chez la souris *mdx*, l'émission de selles est nettement diminuée, mais les poids sec et humide ne sont pas modifiés, ce qui suggère un rôle de la dystrophine dans la contractilité et dans la motilité du tube digestif, par opposition à des altérations d'absorption et de sécrétion. En effet, des contractions plus importantes ont été enregistrées chez la souris *mdx* en comparaison aux contrôles, à l'âge de 8-12 semaines. Les complexes moteurs migrants (CMM), qui sont des contractions caractéristiques de la période de jeûne sont dérégulées et augmentent en fréquence chez la souris *mdx* [12].

D. Atteinte diaphragmatique

Le diaphragme est un muscle strié en constant mouvement. Chez les patients DMD, le diaphragme est affaibli dans les premières années de l'adolescence avec des signes évidents d'épaississement du muscle dû à une accumulation de tissu adipeux et fibreux. La force de contraction est également diminuée, entraînant une hypoventilation et une hypercapnie. En effet, la détresse respiratoire est la cause la plus commune de mort prématurée chez les patients DMD et la ventilation artificielle a permis d'améliorer l'espérance de vie chez les patients atteints d'insuffisance respiratoire avancée [12].

L'évolution de l'atteinte diaphragmatique chez la souris *mdx* ressemble fortement à ce qui se passe chez l'homme [94], avec une fibrose extensive évidente à partir de 12 semaines d'âge et progressant jusqu'au décès, bien qu'elle ne soit pas aussi sévère que chez l'homme. C'est le seul muscle chez la souris *mdx* qui échappe à la règle de la dégénérescence modérée qui atteint les autres muscles de l'organisme. La force de contraction est également diminuée précocement au niveau du diaphragme chez les souris *mdx*. L'atteinte diaphragmatique chez la souris *mdx* permet donc de bien modéliser l'atteinte chez l'homme. Cette dégénérescence et cette fibrose sont également retrouvées chez le rat *Dmd* (*figure 46*) [29].

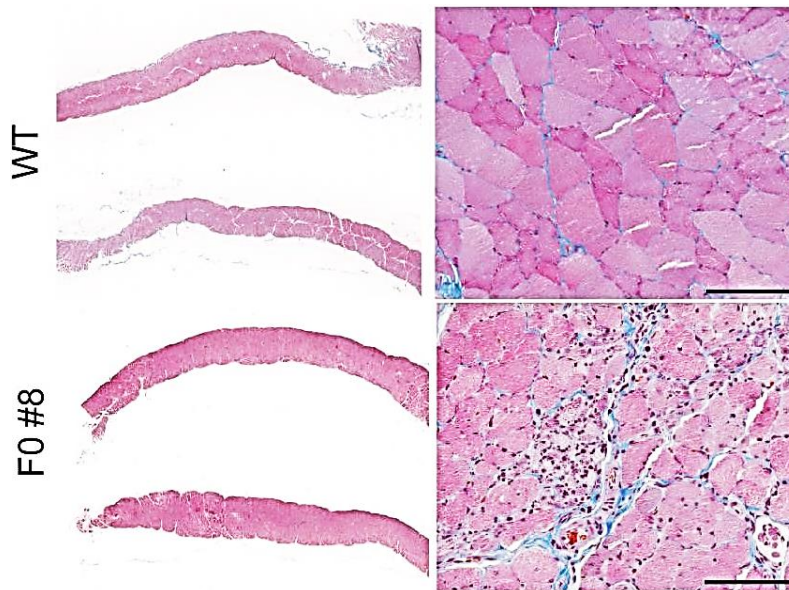


Figure 46 : Coloration au trichrome de Masson de diaphragmes chez des rats *Dmd* (FO#8) de 13 semaines d'âge et de contrôles sains (WT) du même âge. Echelle=100 μ m. On note un épaissement du diaphragme chez les rats *Dmd*, ainsi qu'une infiltration par du tissu fibreux [29].

Par ailleurs, lors de dystrophinopathies on observe au cours de l'évolution de la maladie, une prédominance de fibres musculaires de type I chez l'homme et chez les modèles animaux, notamment chez le modèle porc BMD, où on note une augmentation de 20% des fibres de type I en début d'évolution dans le diaphragme en comparaison aux sujets sains (*figure 47*). Ce changement de type de fibre permet un monitoring précoce de l'évolution de la maladie au niveau du diaphragme [36].

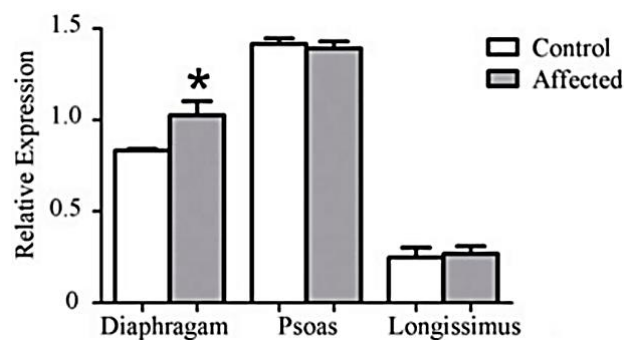


Figure 47 : Pourcentage de fibres de type I dans les différents muscles chez des porcs *Dmd* malades et chez des contrôles sains. On note une augmentation de 20% des fibres de type I dans le diaphragme des porcs *Dmd* comparé aux contrôles sains, tandis qu'au niveau du psoas et du longissimus la différence n'était pas significative, * $P < 0.05$, [36].

Pour conclure, il existe beaucoup de modèles animaux qui permettent de modéliser les myopathies de Duchenne et de Becker. Leur étude ainsi que celle des patients DMD et BMD ont permis de montrer que ces myopathies étaient liées à une atteinte du gène de la dystrophine sur le chromosome X et donc à une diminution ou à une absence de la protéine dystrophine. Il s'agit d'un gène très conservé et son étude est donc comparable entre les différentes espèces. Une mutation qui génère un codon stop est à l'origine d'une myopathie de Duchenne, tandis qu'une mutation qui conserve le cadre de lecture sera plutôt à l'origine d'une myopathie de Becker, même si des exceptions existent. Les manifestations cliniques sont variées et leur gravité peut être corrélée au pourcentage de dystrophine exprimée. Les modèles animaux ont permis de montrer l'importance de la protéine dystrophine et de ses différents domaines de liaison, ainsi que des protéines qui s'y associent, formant le DCG. En effet, ils fournissent un support mécanique en liant la MEC au cytosquelette, mais jouent également un rôle important en tant que plateforme pour les voies de signalisation que ce soit dans les muscles squelettiques, le cœur et le système nerveux entre autres pour réguler l'afflux sanguin, les concentrations en Ca^{2+} , K^+ ... Lors de dystrophinopathies le profil d'expression génétique de ces protéines est modifié, cependant il faut aussi tenir compte du profil d'expression protéique qui peut différer et qui indique la bonne fonctionnalité des protéines. D'autres modèles animaux générés ensuite par croisement ou mutation ont permis d'apporter davantage de précisions. Notamment l'ajout de nouvelles mutations dans ces modèles a permis de montrer l'importance d'autres protéines aussi impliquées dans le développement ou le maintien des muscles, comme le facteur myogénique MyoD, ou l'utrophine. Certains modèles comme le poisson-zèbre permettent des études de développement embryonnaire et ont permis de montrer que la dystrophine est d'abord exprimée au niveau des jonctions myotendineuses puis migre aux sites non-jonctionnels. Son étude permet de voir comment la dystrophinopathie affecte cette migration par exemple. Par la suite certains muscles sont plus atteints que d'autres par la fibrose, l'inflammation, la calcification, etc. et les modèles animaux ont permis de constater que ceux qui sont davantage sollicités sont soumis à un stress mécanique plus important et présentent donc davantage de lésions. Les modèles animaux ont également permis de mettre en place des tests et des mesures standardisés comme le test de marche de 6 minutes, ce qui est important ensuite pour avoir des données comparables et évaluer l'efficacité des différents traitements possibles.

Deuxième partie : Thérapie génique pour traiter la maladie de Duchenne et de Becker à l'aide des différents modèles animaux

- I. Les principes de la thérapie génique
 - A. Actualités sur la thérapie génique dans le cadre de la myopathie de Duchenne et de Becker
 1. Objectifs de la thérapie génique

Actuellement il n'existe aucun traitement curatif des myopathies de Duchenne et de Becker, mais un des objectifs très prometteur est de remplacer ou de réparer le gène de la dystrophine endommagé à l'aide de la thérapie génique. Le but premier de la thérapie génique est d'améliorer la pathologie musculaire et d'accroître la fonction musculaire, soit en convertissant le phénotype Duchenne en phénotype Becker, soit en prévenant ou en ralentissant le développement de la dystrophie musculaire sur des individus traités suffisamment tôt (*figure 48*) [1]. Elle a le potentiel de bénéficier à tous les patients DMD. La thérapie génique systémique sur des garçons aux stades précoces de la maladie pourrait prévenir la dégénérescence musculaire et largement changer l'évolution et la progression de la maladie. Les observations cliniques chez des patients BMD suggère qu'une thérapie génique réussie pourrait permettre aux patients de rester ambulatoires jusqu'à la soixantaine. Pour les garçons atteints déjà d'un stade plus avancé, le but de la thérapie génique est d'améliorer la qualité de vie. La thérapie génique localisée aux muscles des membres permettrait d'améliorer les fonctions de préhension des choses et notamment l'utilisation d'un clavier pour davantage d'autonomie [16].

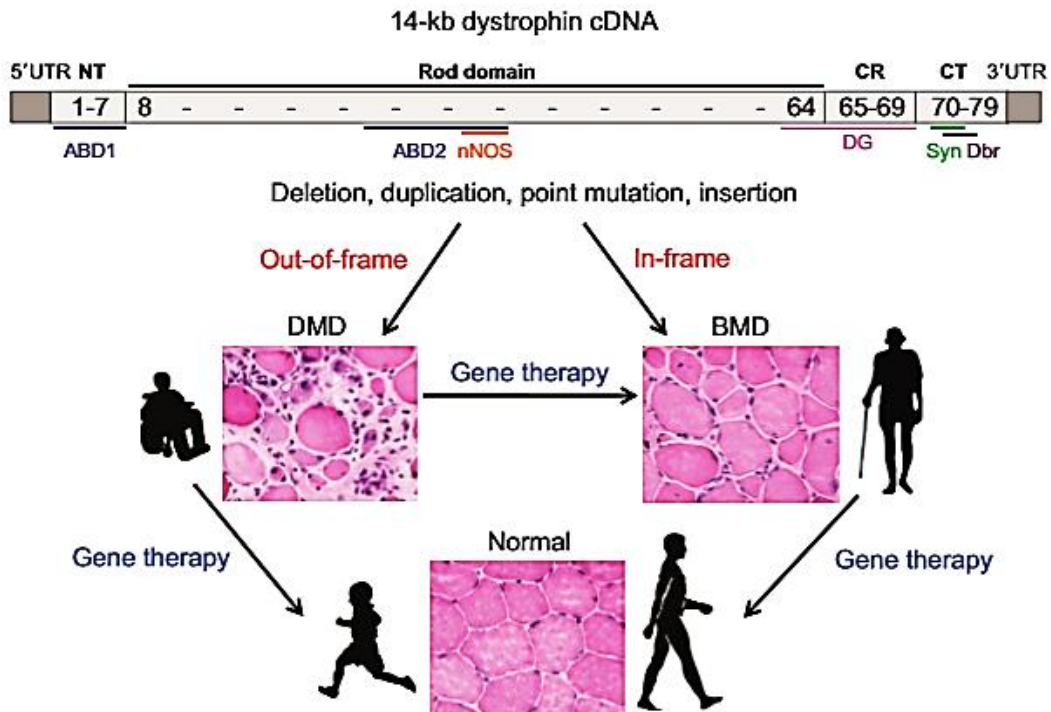


Figure 48 : Thérapie génique en cas de myopathie de Duchenne ou de Becker. Le but est de guérir ou au moins d'atténuer le phénotype de la dystrophinopathie [1].

La thérapie génique utilise des acides nucléiques comme « médicament » afin de traiter des maladies génétiques. Ces acides nucléiques peuvent être de l'ADN, de l'ARN ou des oligonucléotides.

Ils peuvent être nus ou intégrés dans des vecteurs viraux ou non viraux. Actuellement, trois approches différentes sont possibles, le remplacement du gène de la dystrophine déficient, sa réparation ou une thérapie génique indépendante de la dystrophine, ciblant d'autres protéines.

Plusieurs stratégies de thérapie génique ont été développées avec les différents modèles animaux.

2. Principes du remplacement du gène de la dystrophine muté

Il s'agit de remplacer le gène muté de la dystrophine par différents gènes fonctionnels plus ou moins petits intégrés dans des vecteurs viraux ou non. Le gène *Dmd* muté d'origine persiste dans le génome et une copie normale du gène de la dystrophine ou un gène synthétique de la dystrophine est délivré aux muscles afin de produire une protéine dystrophine fonctionnelle. Aussi longtemps que le transgène thérapeutique persiste dans le corps, il devrait produire de manière continue de la dystrophine. A cause des limites de transport des vecteurs viraux, la plupart des thérapies de remplacement de gène utilisent plutôt des versions raccourcies du gène de la dystrophine. Comparé aux mini-gènes existant de manière naturelle (chez les patients BMD par exemple), un gène de la dystrophine synthétique présente certains avantages. En effet, il est possible de produire des gènes synthétiques structurellement et fonctionnellement supérieurs. Les vecteurs viraux eux peuvent être fabriqués afin de produire beaucoup plus de dystrophine qu'une cellule ne peut le faire avec son propre gène. Cependant, la thérapie de remplacement du gène de la dystrophine a également des inconvénients. En effet, le gène de la dystrophine endogène exprime la quantité physiologique de dystrophine dans des tissus cibles et à des moments particuliers. Ces spécificités sont généralement non reproductibles lors de thérapie de remplacement de gène.

Les vecteurs porteurs du gène thérapeutique peuvent être délivrés aux cellules *ex vivo* ou *in vivo*. Lors de délivrance *ex vivo*, les cellules cibles (ex : cellules souches de la moelle osseuse) sont dans un premier temps isolées du corps, puis mises en présence des vecteurs, afin de permettre aux vecteurs de pénétrer les cellules. Les cellules porteuses du vecteur sont ensuite isolées et réinjectées à l'organisme. Lors de délivrance *in vivo*, le vecteur est directement délivré à l'organisme, soit localement de manière ciblée (ex : injection intramusculaire), soit de manière systémique au corps entier (ex : injection intraveineuse). Une fois que le vecteur est délivré dans un tissu, le vecteur entre dans les cellules à travers des récepteurs et des co-récepteurs qui se trouvent à la surface des cellules. Une fois dans la cellule, le vecteur libère le gène thérapeutique au niveau du noyau. Pour les vecteurs AAV (virus associés aux adénovirus), le gène thérapeutique est sous forme ADN simple brin, forme qui ne peut pas être directement traduite en protéines. Il faut donc qu'il soit transformé en ADN double brin, qui pourra être traduit et former la protéine voulue, ici la dystrophine. Dans le tissu musculaire les vecteurs AAV persistent majoritairement sous forme extra-chromosomique circulaire double brin, ce qui n'entraîne pas d'effets secondaires. En revanche, lors d'utilisation de rétrovirus et de lentivirus en tant que vecteurs, le génome viral est de l'ARN, qui est rétro-transcrit en ADN puis intégré au hasard dans le génome. Cette intégration d'un vecteur rétrovirus dans le génome a été à l'origine de l'apparition de leucémies lors de nombreux essais cliniques. Une nouvelle génération de vecteurs rétro/lentivirus a été développée afin de limiter ces effets secondaires. En effet, une fonction d'auto-inactivation notamment empêche le virus de déclencher l'expression inopportune d'un gène proche du site où il s'est inséré [16], [95]. Cependant, ces problématiques d'insertions dans le génome sont des obstacles bien moins importants que les réponses immunitaires contre la capsid ou le produit du transgène lors de thérapie génique, que nous détaillerons par la suite.

3. Principes de réparation du gène de la dystrophine muté

Les stratégies de réparation de gène sont utilisées pour réparer une mutation afin de retrouver un gène de la dystrophine entièrement fonctionnel ou de convertir une mutation de Duchenne en une mutation de Becker. Cela nécessite des recombinaisons homologues, qui s'avèrent très inefficaces dans les cellules musculaires matures, et une matrice de la séquence normale du gène. De plus, ceci n'est applicable qu'aux patients avec de petites mutations, telles que des mutations ponctuelles ou de petites délétions. Pour convertir une mutation de Duchenne en une mutation de Becker, la région mutée et parfois ses régions proximales, sont retirées et les parties restantes sont assemblées. Ceci mène à une protéine dystrophine plus petite mais fonctionnelle. Le saut d'exons est une autre stratégie de réparation, mais elle ne répare pas le gène muté directement. En effet, le gène muté génère des molécules d'ARN pré-messager mutées, qui sont excisées à l'aide d'AONs (oligonucléotides antisens) de la molécule d'ARN lors de l'épissage (saut d'exons). Cependant, le gène muté va continuer à générer des ARNs mutés, ce qui nécessite une délivrance continue d'AONs à la cellule pour une thérapie sur le long terme. On peut donc considérer que le saut d'exons est une thérapie génique « transitoire » [16].

Tableau 7 : Les différentes stratégies de thérapies géniques existantes chez la souris mdx, le chien cDMD et chez l'homme actuellement [1].

	Souris	Chien	Homme
Statut de la thérapie génique			
Vecteurs testés	Non-viraux (plasmides et oligonucléotides), rétrovirus, herpès virus simplex, adénovirus, AAV	Non-viraux (plasmides et oligonucléotides), adénovirus, AAV	Non-viraux (plasmides et oligonucléotides), AAV
Gènes de la dystrophine testés	Microgène, minigène, ADNc entier	Microgène, minigène, ADNc entier	Microgène et gène entier
Stratégies testées	Remplacement par des micro/minigènes et par le gène entier, réparation du gène au niveau ARN/ADN, thérapie génique indépendante de la dystrophine	Remplacement par des micro/minigènes, réparation du gène au niveau ARN/ADN, thérapie génique indépendante de la dystrophine	Remplacement par un microgène via un vecteur AAV, réparation du gène au niveau ARN par saut d'exo, expression de la follistatine via un vecteur AAV
Objectifs actuels	Optimisation des stratégies actuelles, exploration de nouvelles technologies	AAV microgène, AAV saut d'exon	Saut d'exons

Après trente années de développement des modèles souris, les résultats qui y ont été obtenus peuvent être extrapolés et validés sur des animaux symptomatiques de taille plus importante, notamment le modèle chien cDMD comme on le verra par la suite. Le chien ayant une taille similaire à celle des garçons DMD, cela en fait un modèle précieux pour tester expérimentalement la thérapie génique. Chez la souris mdx en revanche le but actuel est d'optimiser les traitements déjà prometteurs, ainsi que le développement de toutes nouvelles stratégies (tableau 7).

B. Comment le gène de la dystrophine fonctionne-t-il ?

1. Petites isoformes naturelles de la dystrophine

La grande taille du gène entier qui code pour la dystrophine constitue l'un des problèmes majeurs pour la thérapie génique, parce que sa taille dépasse ce qu'est capable de transporter un vecteur viral. Une des solutions a été d'essayer de trouver des gènes plus petits mais codant tout de même pour une protéine dystrophine, certes raccourcie, mais fonctionnelle.

En effet, le gène de la dystrophine ne code pas seulement pour la protéine entière de 427-kDa, mais également pour des isoformes plus petites déjà évoquées précédemment, dont la localisation et le poids moléculaire varient (*figure 49 et tableau 8*).

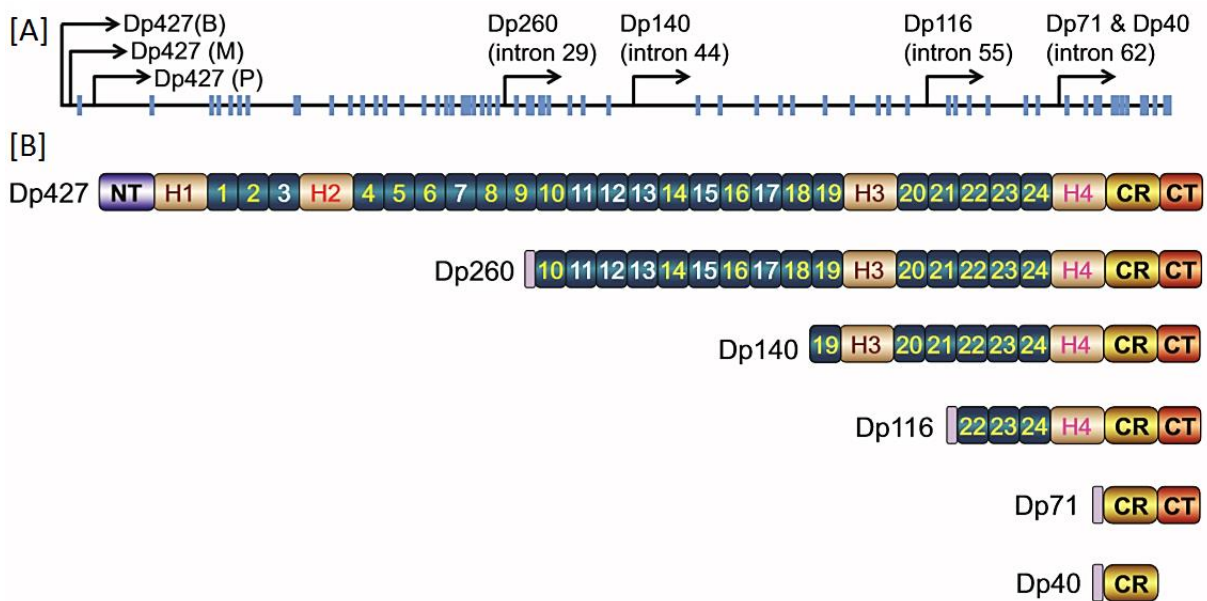


Figure 49 : Les différents isoformes naturels de la dystrophine. (A) Les traits bleus représentent les exons du gène de la dystrophine. Les flèches indiquent pour chaque isoforme l'endroit où démarre la transcription. Il y a trois isoformes de Dp427, (B)= cerveau (brain), (M)= muscles, (P)= cellules de Purkinje. (B) D'autres isoformes de poids moléculaire plus faible, originaires de promoteurs situés dans les différents introns de la dystrophine, sont également exprimés. Dp X sont les différents isoformes de la dystrophine, X indiquant leur poids moléculaire, [1].

A l'exception de Dp140, toutes les autres isoformes de la dystrophine ont des séquences N-terminales uniques, différentes de celle de Dp427. De plus, à l'exception de Dp40, toutes possèdent les domaines Ct et CR [1].

Tableau 8 : Les différentes isoformes de la dystrophine, leurs profils d'expression, leur promoteur et sa localisation et leur poids moléculaire, [34].

Symbole	Isoforme	Promoteur et premier exon unique	Longueur de la protéine	Pattern d'expression de la protéine
Dp427 B	Cerveau	5' du promoteur du muscle	427 kDa	Neurones corticaux, muscles squelettiques et cardiaque
Dp427 M	Muscle	Entre le promoteur du cerveau et l'intron 1	427 kDa	Muscles squelettiques et cardiaque, cellules gliales
Dp427 P	Cellules de Purkinje	Entre l'intron 1 et l'intron 2	427 kDa	Neurones cérébelleux de Purkinje, (muscles squelettiques)
Dp260	Isoformes de la rétine	Intron 29	260 kDa	Rétine, (cerveau et cœur)
Dp140		Intron 44	140 kDa	CNS, reins
Dp116	S-dystrophine	Intron 55	116 kDa	Cellules de Schwann
Dp71	G-dystrophine	Intron 62	71 kDa	Cerveau, foie, muscle cardiaque, (exprimé de manière ubiquitaire dans la plupart des tissus sauf dans les muscles squelettiques)

L'expression est faible dans les tissus entre parenthèse

Afin de savoir si ces isoformes miniatures sont intéressantes d'un point de vue thérapeutique, des laboratoires ont créé des modèles souris transgéniques pour les isoformes Dp260, Dp116 et Dp71. Ces souris transgéniques surexpriment l'isoforme DpX. Leur croisement avec des souris mdx permet d'évaluer si la surexpression de l'isoforme DpX chez des souris malades permet d'améliorer le phénotype et dans quelle mesure.

D'autres isoformes naturelles de la dystrophine ont été trouvées grâce à des études de cas, comme chez une portée de chiens Spitz japonais mâles, où le western blot a permis de mettre en évidence une protéine dystrophine tronquée d'environ 70-80kDa. Cependant, ces chiens manifestaient une clinique sévère signe que cette isoforme n'était pas assez grande pour protéger contre la dystrophie et que certaines parties essentielles de la protéine manquaient [96].

Il existe donc des isoformes naturelles de la dystrophine, qui ont un poids moléculaire bien plus faible que la dystrophine classique, ce qui est intéressant dans le cadre de la thérapie génique où il est difficile de travailler avec un gène aussi grand que l'est celui de la dystrophine. Reste à savoir dans quelle mesure on peut réduire la taille de la protéine et quelles sont les parties de la protéine qui sont essentielles à son fonctionnement et celles qui le sont moins.

2. Quelle est l'importance des différents domaines de la dystrophine ?

Les isoformes de la dystrophine ayant toutes des domaines N-terminaux différents, la question de son importance se pose. Deux lignées différentes de souris transgéniques pour Dp260 ont été étudiées [1]. En effet, la protéine Dp260, isoforme présente dans la rétine, présente un domaine Nt différent et donc pas de domaine ABD1 (actin binding domain), site de liaison à l'actine, mais possède toujours le domaine ABD2, un autre site de liaison à l'actine (*figure 50*). Il reste à savoir dans quelle mesure ce site à lui seul permet d'assurer la liaison à l'actine et si en effet on peut se passer du site ABD1.

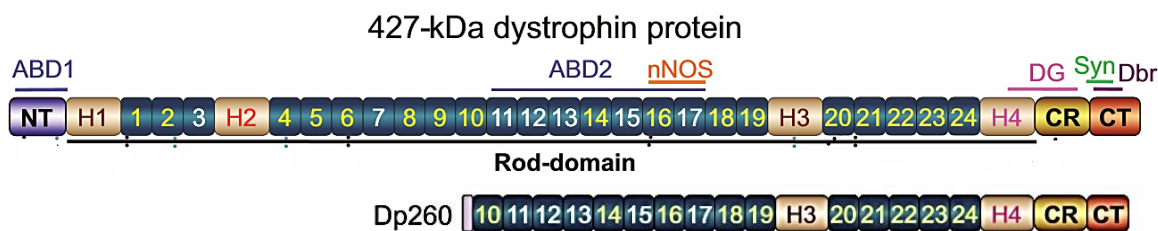


Figure 50 : Isoforme Dp260 de la dystrophine. Il manque le domaine Nt et une partie du 'rod-domain'. ABD=actin binding domain. nNOS=oxyde nitric synthase neuronale. DG=dystroglycane. Syn=syntrophine. Dbr=dystrobrevine [1].

Malgré une protéine raccourcie, la surexpression de Dp260 chez des souris mdx et utrophine/dystrophine double-ko, diminue de manière significative le phénotype dystrophique mais n'empêche pas entièrement la dégénérescence musculaire, l'inflammation et la fibrose. Il semblerait donc que le domaine Nt soit nécessaire pour une protection musculaire maximale, mais que les isoformes qui ne le contiennent pas permettent tout de même d'améliorer le phénotype [1]. Le site de liaison ABD2 permet donc d'assurer une certaine liaison entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire.

L'importance du domaine C-terminal a été évaluée en réalisant sa délétion [97]. Malgré une suppression du domaine Ct dans sa totalité, la protéine est quand même capable de lier la syntrophine et la dystrobrevine au sarcolemme et ainsi de conserver une stabilité du sarcolemme. La dystrophine sans domaine C-terminal protège quand même entièrement les jeunes souris mdx adultes. On a également observé à travers de cas cliniques chez l'homme, que chez les individus avec une mutation entraînant la perte d'une partie ou la totalité du domaine Ct, le phénotype de la maladie était modéré [1].

D'autres études de cas ont permis de mieux comprendre l'importance des différents domaines de la dystrophine. C'est notamment le cas, en 1990, d'un anglais atteint d'une forme atténuée de la myopathie de Duchenne [98]. A 61 ans ce dernier était toujours ambulateur et l'étude a montré que cet homme présentait pourtant une importante délétion dans le 'rod domain' ($\Delta 17-48$), éliminant ainsi 46% de la séquence codante. Ces micro-dystrophines permettent de trouver des microgènes, potentiels candidats pour la thérapie génique.

Ce sont donc des isoformes naturelles, ainsi que des isoformes naturelles « accidentelles » qui ont dans un premier temps permis de déterminer quels domaines ne sont pas indispensables au bon fonctionnement de la dystrophine et pourraient être supprimés dans le but de réduire la taille de sa partie codante.

3. Mini et micro-gènes synthétiques pour une protéine dystrophine plus courte

Une approche alternative à la recherche d'une isoforme naturelle de la dystrophine la plus petite et fonctionnelle possible, est d'en créer une artificiellement.

Sur la base du cas de 1990, une expression transgénique du minigène $\Delta 17-48$ a été tentée chez des souris mdx en 1995, en espérant la synthèse d'une petite protéine dystrophine fonctionnelle. En effet son expression a permis de réduire de manière significative la pathologie musculaire et d'augmenter la force musculaire [99].

Le minigène a été par la suite encore réduit en supprimant d'autres domaines non nécessaires au bon fonctionnement de la protéine dystrophine, menant à des minigènes tels que $\Delta H2-R19$ en 2002 ou $\Delta H2-R15$ en 2009, gène un peu plus grand que le précédent mais qui conserve le site de liaison à la protéine nNOS (figure 51). Il a en effet été constaté que le domaine R16/17 du

'rod-domain' qui se lie à la protéine nNOS permet d'augmenter la protection musculaire et la capacité physique, en conservant la voie de signalisation qui en découle. Les minigènes de la dystrophine font donc entre ~6 à 8 kb en général [1].

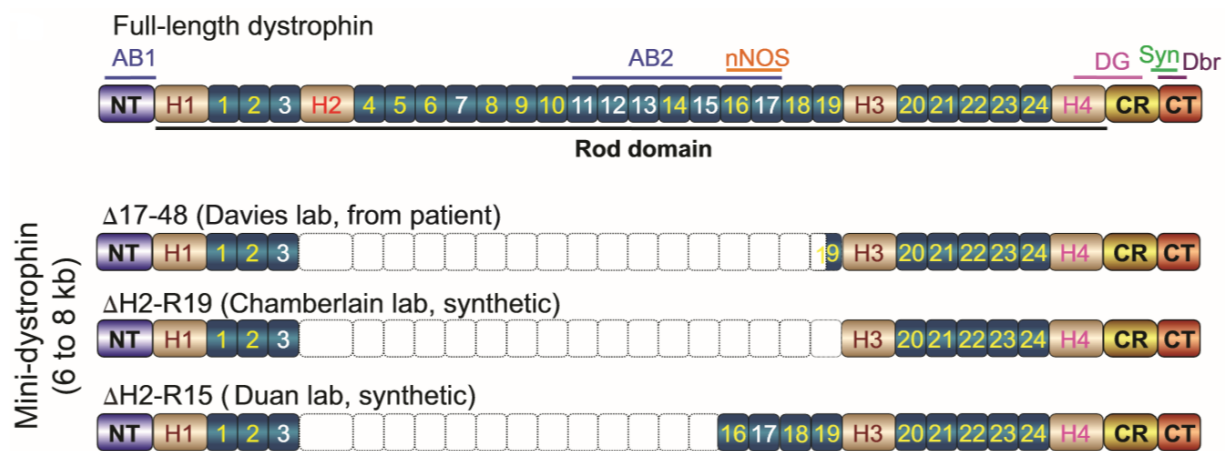


Figure 51 : Synthèse artificielle de deux nouveaux mini-gènes Δ H2-R19 et Δ H2-R15 pour la dystrophine à partir d'un mini-gène Δ 17-48 découvert chez un patient DMD présentant une forme atténuée [1].

Un des inconvénients est que malgré la diminution importante de la taille du gène à ~6-8 kb, il ne rentre toujours pas dans les vecteurs viraux qui ont une capacité de transport de maximum 5 kb, pour les vecteurs utilisables dans ce cadre.

D'autres études transgéniques dans les années 2000 ont permis de réduire encore davantage la taille du gène de la dystrophine. En effet, sachant que la majorité du 'rod domain', à l'exception de la partie R16/17, et l'ensemble du domaine C-terminal ne sont pas nécessaires pour la fonctionnalité de la protéine dystrophine, plusieurs versions de micro-gènes, c'est à dire des gènes de moins de 4kb, ont été créés (figure 52). Ces micro-gènes permettent de diminuer grandement les dommages musculaires chez les souris mdx [1].

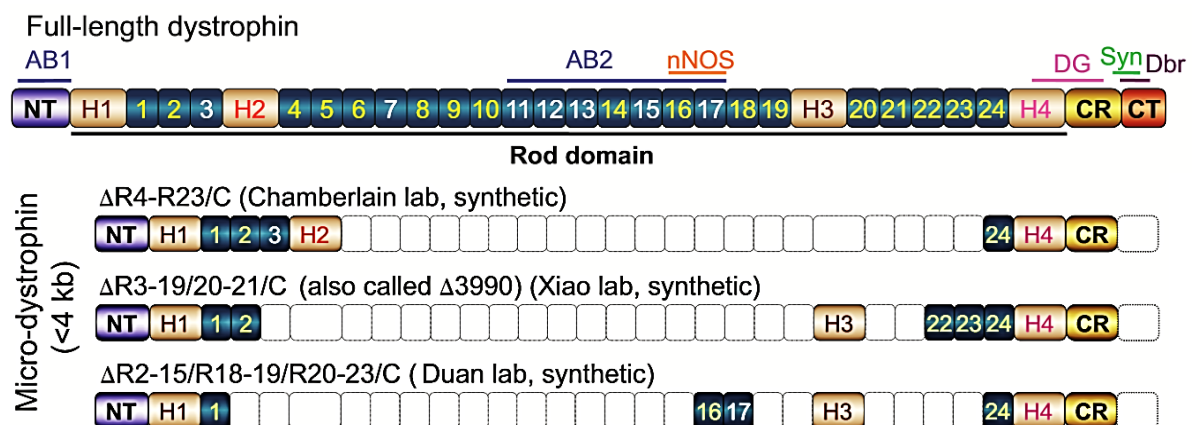


Figure 52 : Synthèse artificielle de micro-gènes de moins de 4kb. Suppression de certaines régions telles que le domaine Ct, ainsi que la majeure partie du rod domaine [1].

Par ailleurs, au cours des dernières années (2002-2013) plusieurs caractéristiques importantes sur la biologie de la dystrophine, inconnues jusque-là, ont été découvertes [100].

Premièrement, les mini-dystrophines avec un nombre pair d'unités spectrine-like sont plus fonctionnels que ceux à nombre impair. Deuxièmement, la charnière H2 de par son site poly-proline

a un effet délétère sur la fonction des micro-dystrophines [101]. Troisièmement, comme déjà vu précédemment, les unités spectrine-like 16 et 17 (R16/17) sont nécessaires pour permettre la liaison de la nNO synthase au sarcolemme afin d'éviter l'ischémie. Quatrièmement, l'optimisation des codons permet d'augmenter de manière significative la fonction des micro-dystrophines, en augmentant la stabilité des ARNm et donc en augmentant l'efficacité de la traduction [102].

Afin de savoir si la prise en compte de ces données améliore les performances des micro-gènes dans les muscles des grands mammifères, le microgène $\Delta R215/\Delta R18-19/\Delta R20-23/\Delta C$ a été généré en 2013 [100]. Il code pour une protéine possédant quatre unités spectrine-like, donc deux sont R16 et R17. De plus, la charnière H2 a été remplacée par la charnière H3 (*figure 52*). Il a été injecté à des souris mdx et à des chiens dystrophiques à l'aide d'un vecteur AAV [103]. Son administration systémique a permis de restaurer l'expression de la nNO synthase au niveau du sarcolemme et d'améliorer la fonction musculaire chez la souris mdx (*figure 53*). Ce micro-gène a également été injecté en intramusculaire à six chiens dystrophiques de race aléatoire (10-28 mois d'âge), ce qui a entraîné une expression maximale de la micro-dystrophine et une amélioration marquée des lésions histologiques. En effet, l'infiltration par les macrophages, la fibrose et la calcification furent nettement réduites. On peut noter que ce micro-gène a entre autres permis de protéger le muscle contre une perte de force excentrique induite par les contractions musculaires, et qui constitue une caractéristique physiologique importante de la myopathie de Duchenne. Actuellement, une amélioration physiologique convaincante dans le modèle canin n'a été obtenue qu'après le traitement avec ce micro-gène $\Delta R215/\Delta R18-19/\Delta R20-23/\Delta C$ [1]. Il semblerait donc que cette micro-dystrophine qui tient compte des domaines importants de la biologie de la dystrophine, puisse améliorer la dystrophie musculaire chez les grands mammifères et donc potentiellement chez l'homme. Ce micro-gène $\Delta R215/\Delta R18-19/\Delta R20-23/\Delta C$ constitue donc un excellent candidat pour le traitement de la myopathie de Duchenne chez l'homme.

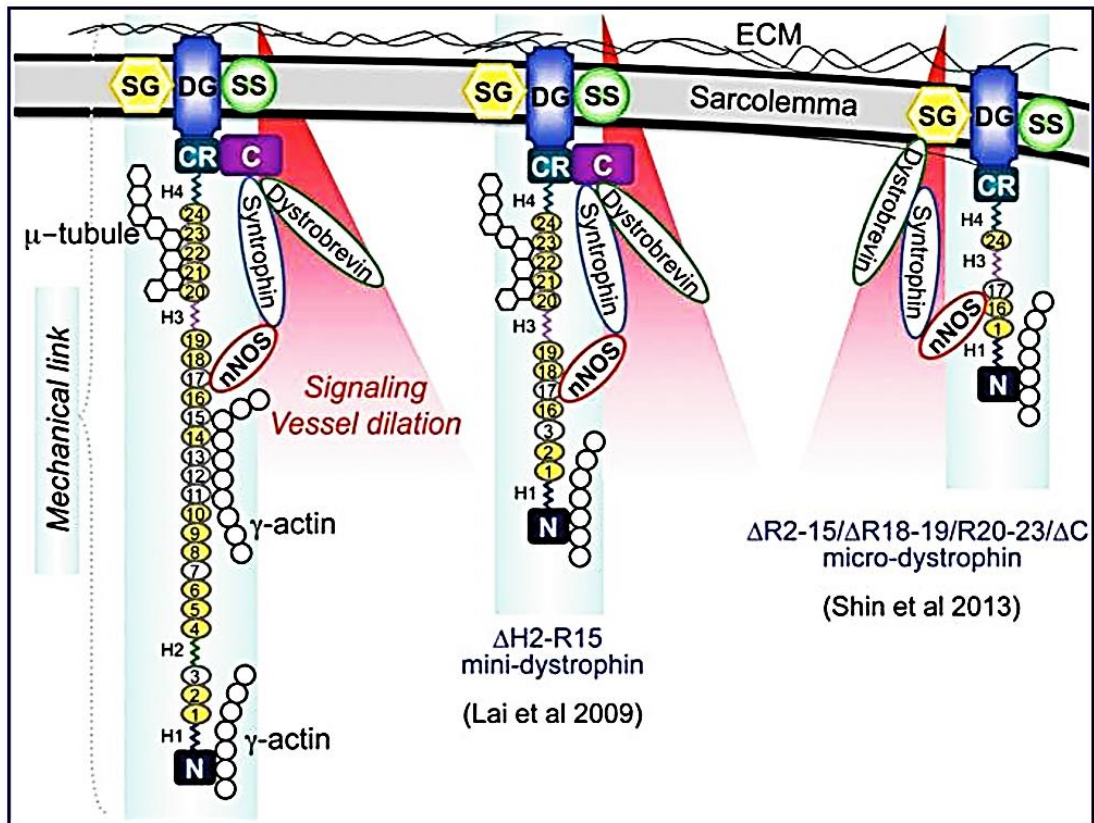


Figure 53 : Dystrophine, mini-dystrophine, micro-dystrophine et le complexe de protéines DGC. Le complexe DGC permet un support mécanique, ainsi que l'émission de signaux pour le muscle. L'oxyde nitrique NO généré par la nNO synthase permet de dilater les vaisseaux sanguins pendant la contraction musculaire pour palier à ses besoins métaboliques. Les mini-dystrophines font environ la moitié de la taille de la dystrophine. La mini-dystrophine $\Delta H2-R15$, qui en est représentative, possède tous les domaines fonctionnels connus de la dystrophine entière. Les micro-dystrophines font environ un tiers de la taille de la dystrophine entière. La micro-dystrophine $\Delta R2-15/\Delta R18-19/\Delta R20-23/\Delta C$, qui en est représentative, a permis de restaurer l'expression au niveau du sarcolemme de la nNO-synthase chez la souris mdx et d'améliorer la fonction musculaire chez des chiens dystrophiques adultes.
 C : domaine Ct; CR : domaine riche en cystéines; DGC : complexe de dystroglycanes; ECM : matrice extracellulaire; H : régions charnières; N : domaine Nt; SG : complexe de sarcoglycanes; SS : sarcospane. Les nombres indiquent les unités spectrine-like dans le rod domaine [103], [100].

Il a donc été possible de réduire la taille de la séquence codant pour une protéine dystrophine raccourcie mais fonctionnelle et d'observer une amélioration clinique chez les souris mdx, mais aussi chez d'autres modèles animaux plus grands tels que les chiens cDMD. Il est à noter que pour les essais cliniques chez l'homme, il sera nécessaire de développer des versions « humaines » des mini/micro-dystrophines afin d'optimiser au mieux la tolérance chez l'homme.

C. Détermination du niveau d'expression du gène nécessaire pour un effet thérapeutique

Deux questions essentielles doivent être soulevées pour mettre en place une thérapie génique, une fois qu'on a le gène que l'on veut exprimer. Quelle quantité de dystrophine suffit-il pour améliorer la maladie et y a-t-il un seuil à ne pas dépasser ? Il s'agit donc de savoir à quel niveau il faut exprimer le gène de la dystrophine pour engendrer un effet thérapeutique sans avoir trop d'effets secondaires.

Une étude sur des souris mdx a montré qu'une surexpression environ cinquante fois plus élevée de la dystrophine entière par rapport au niveau endogène chez des contrôles sains, n'était pas toxique pour les muscles squelettiques, ce qui confère donc une marge de sécurité assez élevée pour obtenir un effet thérapeutique [104]. D'autres études sur des souris mdx ont essayé de trouver le seuil à partir duquel la surexpression de la dystrophine engendre une protection histologique et physiologique. Une expression de la protéine dystrophine à environ 20% du niveau d'expression normal, atténue de manière significative l'atteinte musculaire et augmente la contractilité musculaire [1]. L'étude des modèles souris mdx3cv et mdxXistΔhs, qui sont des modèles exprimant la protéine dystrophine à un niveau autour de 5%, et le croisement de souris utrophine/dystrophine double-ko avec ces souris mdx3cv, montre que l'expression à 5% de la dystrophine préserve quand même une partie de la fonction musculaire chez les souris mdx et augmente l'espérance de vie chez les souris doublement mutées utrophine/dystrophine [1].

Une corrélation évidente entre le niveau d'expression de la dystrophine et les signes cliniques a également été notée chez les patients. En effet, les individus exprimant la protéine dystrophine à un taux supérieur ou égal à 20% sont souvent encore ambulatoires à l'âge de 20 ans. Une étude a même rapporté le cas d'un individu dont l'expression de la dystrophine s'élevait à 30% et qui à 23 ans était exempt d'atteinte musculaire. Ce qui est intéressant à noter, c'est que ce taux de 30% est le même que celui auquel on a conclu pour le modèle souris mdx [105].

Le modèle canin cDMD a également permis d'apporter des informations quant au niveau minimal d'expression de la dystrophine nécessaire pour protéger le muscle chez les mammifères. 20 à 50% de cellules positives à la dystrophine seraient suffisantes pour améliorer la force musculaire. De plus, une correction de 33%, 35% et 40% des myofibres entraîne respectivement des améliorations histopathologiques, des améliorations à l'IRM, ainsi qu'une préservation de la fonction musculaire. Par ailleurs, un niveau d'expression de 15-20% du niveau normal de la dystrophine serait protecteur pour le cœur, ce qui avait déjà été observé chez la souris mdx. Cependant, il est à noter que ces seuils diffèrent entre les souris et les chiens lorsqu'on utilise des micro-dystrophines. En effet, l'expression d'une micro-dystrophine dans 20% des myofibres n'a pas protégé les muscles chez le chien, tandis qu'au même niveau d'expression, la fonction musculaire a été améliorée chez la souris mdx [106], [100].

Il semble donc y avoir un consensus interspécifique sur le fait qu'une restauration de l'expression de la protéine dystrophine à un niveau minimal entre 20 et 30% est nécessaire pour améliorer la maladie de manière significative, même si les études sur des modèles souris suggèrent que même un faible taux d'expression de la protéine autour de 5% peut s'avérer bénéfique pour améliorer les signes cliniques. Cependant, chaque mini/micro-dystrophine mérite une étude, leur efficacité pouvant varier. En effet, il est nécessaire d'établir les profils de sécurité et les index thérapeutiques des injections locorégionales, de tester différentes doses, pour optimiser les protocoles d'injection et évaluer les risques concomitants, tels que les réactions immunologiques envers les vecteurs et la dystrophine produite. De plus, il s'agit de s'intéresser ensuite aussi plus spécifiquement à l'amélioration que cela apporte aux différents organes individuellement, certains organes, tels que le cœur, semblant plus difficilement atteignables et nécessitant des injections à des doses peut être plus élevées.

D. Traiter les précurseurs des cellules musculaires ?

Les cellules musculaires lors de myopathie de Duchenne et de Becker subissent des dégénérescences puis des régénérations, lors desquelles des précurseurs ou des cellules musculaires elles-mêmes sont incorporés dans les fibres musculaires. Le traitement des cellules précurseurs a donc fait l'objet de plusieurs études puisque rétablir l'expression de la dystrophine dans ces cellules permettrait de rétablir l'expression de la dystrophine dans les fibres musculaires par la suite. Cependant, la délivrance directement par exemple de microdystrophine via un vecteur AAV à des

cellules souches musculaires aurait un effet limité, puisque le vecteur AAV persiste surtout en tant que molécule circulaire, donc dès que la cellule souche commence à se diviser, le vecteur AAV se trouve dilué, voir perdu parmi les cellules filles après plusieurs cycles de division cellulaire, même si une petite partie du virus peut s'intégrer dans le génome de la cellule. Ce problème pourrait être résolu par l'utilisation, comme vecteurs du gène de la dystrophine, de virus qui s'intègrent au génome, tels que les lentivirus ou les rétrovirus [16]. Cependant, il s'agit de vecteurs moins sûrs que ne le sont les vecteurs AAV.

Une autre solution est d'apporter les mécanismes de réparation du gène de la dystrophine directement aux cellules précurseurs des cellules musculaires, afin que le gène corrigé de la dystrophine persiste dans les cellules filles [107].

E. Les réponses immunitaires cellulaires et humorales, un défi important

La réponse immunitaire de l'hôte reste sans doute l'obstacle le plus difficile à surmonter en thérapie génique. Elle est influencée par la capsid des vecteurs viraux, la quantité de vecteur, ainsi que sa pureté et les méthodes de production et de purification de ces vecteurs. Puis elle dépend également de la voie d'administration, de l'âge de l'animal et de l'immunité préexistante. Il faut aussi prendre en compte la cassette d'expression (promoteur et site de liaison au micro-ARN), l'immunosuppression possible, l'espèce cible et l'espèce dont provient le transgène (*figure 54*). Par ailleurs, la production de vecteurs à plus grande échelle, qui est nécessaire lorsqu'on quitte les modèles de petite taille, pose le problème de risquer d'amplifier des contaminations qui sont négligeables dans les préparations à petite échelle, mais qui peuvent prendre leur importance à plus grande échelle [108].

En effet, par exemple les virus associés aux adénovirus (AAV) sont les vecteurs viraux les plus au point pour la thérapie génique de la myopathie de Duchenne. Cependant, la réaction immunitaire qu'ils engendrent décourage de leur utilisation [109]. Par ailleurs, des cellules T agissant contre le transgène thérapeutique, peuvent être déjà présentes chez les patients avant le traitement, ce qui suggère que ces patients avaient probablement été sensibilisés aux épitopes de la dystrophine.

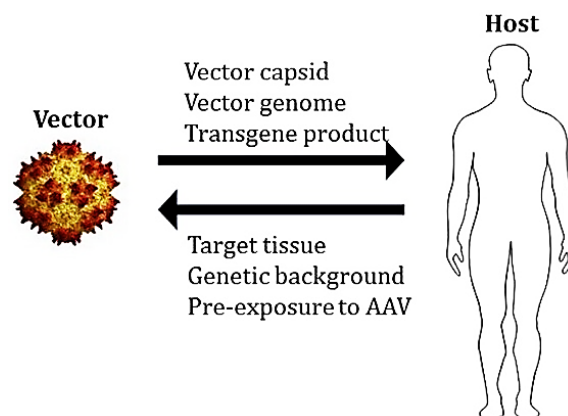


Figure 54 : Le virus associé aux adénovirus (AAV) et ses interactions avec l'hôte. Les composants des vecteurs AAV interagissent avec l'hôte, son génome et son système immunitaire, et déterminent l'issue du transfert de gène [109].

Il a régulièrement fallu adapter le modèle souris pour qu'il représente mieux la maladie chez l'homme et facilite l'étude physiopathologique ainsi que l'observation des effets des traitements. En effet, les souris mdx ont un phénotype atténué par rapport à l'homme DMD. La plupart des différences observées par rapport à l'homme ont pu être surmontées par la création de nouveaux

mutants souris mdx. Cependant, la souris mdx ne permet pas de modéliser de manière précise la réponse immunitaire face aux vecteurs de la thérapie génique, observée chez les patients DMD.

En effet, deux barrières essentielles à la recherche translationnelle, c'est-à-dire au passage des connaissances acquises en recherche fondamentales, notamment chez la souris, à leur utilisation concrète chez l'homme, sur la thérapie génique de la myopathie de Duchenne sont observées. Il s'agit d'abord des réponses immunitaires cellulaires et humorales du patient DMD contre les vecteurs viraux, soit contre leur capsid, soit contre les protéines exprimées par le vecteur viral, qu'on ne retrouve pas chez le modèle souris mdx : il est à présent certain que le vecteur qui délivre le gène (capsid), le transgène ou la protéine produite par la transcription/traduction du transgène thérapeutique peut engendrer une réponse immunitaire inadaptée [16]. Il est donc nécessaire pour une thérapie génique à long terme de passer outre le système immunitaire. La deuxième barrière est la question de la production en plus grande quantité des vecteurs viraux pour pouvoir délivrer plus de vecteurs aux patients DMD, pour lesquels des quantités plus importantes sont nécessaires que pour les souris mdx. C'est donc aussi cette administration de milliards de particules virales à des enfants dystrophiques qui pourrait engendrer des réponses inflammatoires et/ou immunitaires inattendues et des complications fatales, non observées chez les modèles souris.

Ces limites observées avec le modèle souris pourraient être surmontés avec le modèle canin notamment, car c'est un modèle plus grand et qui affiche une réponse immunitaire similaire à celle des patients DMD face aux traitements [100]. En effet, le modèle canin sera utile pour essayer de comprendre les mécanismes sous-jacents de cette réponse immunitaire et pour essayer de développer des stratégies pour s'y soustraire. Une suppression immunitaire transitoire de 5 semaines chez des chiens dystrophiques a apporté des résultats prometteurs. Par ailleurs, l'utilisation transitoire de fortes doses de stéroïdes à effet immunosuppresseur, pour la thérapie génique dans le cadre d'autres maladies (hémophilie B, dystrophie musculaire spinale), a permis de bons résultats de transduction [16]. Une différence existe aussi selon si les injections du vecteur se font en intramusculaires ou en intravasculaires [2]. En effet, les injections locales diminuent à priori les risques d'effets secondaires systémiques, mais elles augmentent le risque de réactions immunitaires au niveau des muscles, du fait de concentrations importantes en antigènes [110].

D'autres modèles tels que le porc DMD pourraient aussi aider à comprendre ces problèmes.

Il est donc important lorsque l'on passe aux essais cliniques chez l'homme de rechercher une immunité pré-existante contre les vecteurs et le transgène utilisés. De plus, les vecteurs sont améliorés en permanence afin d'être le moins immunogène possibles. Cependant, la myopathie de Duchenne/Becker est une maladie à vie, or les études les plus longues ont été menées sur 4 mois. Il est donc important de réaliser des études sur le long terme afin de pouvoir observer s'il y a des réponses immunitaires retardées ou des toxicités non prévues qui pourraient se révéler avec le temps [16].

II. Le remplacement du gène défectueux de la dystrophine

A. Les fibres musculaires révertantes

Bien que la myopathie de Duchenne soit caractérisée par une absence ou une réduction de la quantité de dystrophine, de la dystrophine "résiduelle" est détectée chez plus de 50% des patients DMD, qui expriment des fibres musculaires révertantes contenant de la dystrophine [12]. Ces fibres proviennent d'un épissage qui court-circuite la mutation à l'origine de la maladie et qui permet de restaurer une protéine dystrophine fonctionnelle. Ces fibres ne représentent que 1-7% de toutes les fibres musculaires, ce qui n'apporte qu'un faible effet bénéfique sur la fonction musculaire. Ces fibres révertantes sont aussi présentes chez la souris mdx et sont souvent observées chez les modèles animaux de déficience en dystrophine [111], [28]. Le mécanisme exact qui en est à l'origine reste cependant mal compris.

Le fait que ces fibres révertantes n'induisent pas de réaction immunitaire a permis d'émettre l'hypothèse que le remplacement de la dystrophine pourrait être une alternative thérapeutique envisageable de la myopathie de Duchenne et de Becker. Le modèle souris mdx52 (perte de l'exon 52) n'exprime pas de fibres révertantes, ce qui est intéressant lors des études de remplacement du gène défectueux de la dystrophine, pour pouvoir quantifier l'expression de la dystrophine induite sans biais.

B. Remplacement du gène défectueux par la séquence entière codant pour la dystrophine

S'il était possible de délivrer aux fibres musculaires un gène de la dystrophine fonctionnel, le traitement serait trouvé. Malheureusement ce n'est pas si simple. Plusieurs stratégies ont été développées afin de permettre la libération de l'ADNc de 14 kb de la dystrophine dans sa totalité. Peu après la découverte du gène de la dystrophine, des injections de plasmides contenant l'ADNc complet ont été tentées chez des souris mdx [1]. D'autres études ont testé l'injection intramusculaire de plasmides chez des chiens cDMD, cependant la transduction s'est avérée faible (moins de 1% de cellules positives à la dystrophine) et l'expression de la protéine fugace. Les plasmides ont donc été peu utilisés [100].

L'adénovirus dénudé de tous ses gènes viraux ("gutté-adenovirus"="adénovirus dénudé"), donc moins immunogène, peut contenir un génome de 35 kb et a donc été utilisé à partir de 1996 pour exprimer la totalité du gène de la dystrophine en transportant l'ADNc complet de la dystrophine [1]. Des essais effectués sur des souris mdx et des souris utrophine/dystrophine double-ko ont mené à des résultats prometteurs. En effet, huit semaines après l'injection d'adénovirus dénudé transportant l'ADNc entier dans de multiples muscles, la dystrophine était largement exprimée et le nombre de fibres avec une nucléation centrale était significativement réduit. Le poids des souris double-ko traitées était augmenté, ainsi que les performances motrices et l'espérance de vie [112]. Le défi actuel réside dans la réponse immunitaire de l'hôte face à la capsid de l'adénovirus et la contamination avec la souche sauvage de l'adénovirus [1], qui génère une immunité pré-existante et neutralise donc le vecteur.

Les herpes virus (simplex) ont également une grande capacité de transport (~150 kb) et ont donc aussi été testés pour acheminer l'ADNc entier de la dystrophine à partir de 1999 [1]. Cependant peu d'études sur les modèles animaux ont été effectuées avec ces virus, à cause de leur toxicité.

L'utilisation de vecteurs viraux pour la thérapie génique utilisant la séquence codant pour la dystrophine entière a ensuite fait de nombreux progrès. Les virus associés aux adénovirus (AAV) se sont révélés être les outils les plus adaptés comme vu précédemment, n'étant pas pathogènes et ayant la capacité d'infecter des cellules qui ne sont pas en division, ce qui est important pour le traitement des muscles. La capacité maximale de transport des vecteurs AAV étant de 5kb, ceci exclut le transport de l'ADNc complet de la dystrophine [100].

Récemment, en 2014, des vecteurs tri-AAV, vecteurs qui résultent de l'association de trois virus AAV pour augmenter la capacité de transport, ont été testés pour le transport de l'ADNc entier de la dystrophine [1]. C'est un système où l'ADNc est divisé en trois fragments dont les extrémités se superposent. Chaque fragment est intégré séparément dans un vecteur AAV. La co-infection avec les trois vecteurs AAV permet de produire la protéine dystrophine dans sa totalité grâce à la recombinaison des régions qui se superposent. La réussite de cette méthode repose sur une recombinaison efficace de ces régions. Cette méthode a été testée sur des souris mdx et mdx4cv via une injection intramusculaire, cependant cette méthode nécessite encore de travailler sur une meilleure transduction pour observer des bénéfices thérapeutiques. En effet, l'efficacité de reconstitution de la dystrophine est faible, même si le système en soi fonctionne [113].

C. Remplacement du gène défectueux de la dystrophine par de petits gènes artificiels

Nous avons vu précédemment qu'il a été possible de créer des mini- et micro-gènes de la dystrophine en supprimant les parties de la protéine qui s'avèrent ne pas être indispensables, pour aboutir à des mini- et micro-dystrophines fonctionnelles. Reste à savoir comment amener ces gènes dans l'organisme pour permettre l'expression d'une dystrophine fonctionnelle et s'ils permettent de correctement traiter la dystrophinopathie.

Les mini-gènes de 6 à 8kb ont été testés avec des plasmides, adénovirus, rétrovirus et vecteurs AAV.

L'utilisation de rétrovirus, hors lentivirus, en 1993 s'avère très inefficace car ils n'infectent pas les cellules musculaire post-mitotiques [1].

La première génération d'adénovirus délété pour la région E1, région du génome adénoviral essentiel à l'expression de presque tous les autres gènes de l'adénovirus, a été utilisée à partir de 1993 pour acheminer le mini-gène $\Delta 17-48$ (figure 51) à des souris mdx et des chiens cDMD. Bien que ce vecteur soit plus efficace que les rétrovirus, il engendre une forte réponse immunitaire chez les souris mdx. Comparé aux injections de plasmides, l'injection d'adénovirus à des chiots cDMD permet une transduction beaucoup plus efficace [100]. Cependant, l'expression de la mini-dystrophine ne dure jamais très longtemps à cause de la forte réponse immunitaire à l'encontre de l'adénovirus vecteur et de la mini-dystrophine humaine. Le transfert de mini-dystrophine par des adénovirus a donc également été testé en 1998 chez des chiens cDMD immuno-déprimés afin d'essayer d'améliorer la transduction [2]. Mais l'utilisation de la cyclosporine immuno-suppressive ne permet que modérément de prolonger le transfert de gène.

Les vecteurs AAV intéressants car capables de libérer le gène de la dystrophine aux muscles par voie systémique de manière importante, notamment aux muscles du cœur, ont également été testés dans les années 2000 chez la souris mdx et le chien cDMD [59]. L'utilisation de deux vecteurs AAV associés, dual-AAV, a été testé pour transporter des mini-gènes dont la taille moyenne est de 7kb et qui ne peuvent donc pas être transportés par un seul vecteur AAV. Dans ce système, l'expression du mini-gène est permise par le transport de la moitié du mini-gène par chacun des deux vecteurs AAV, de manière similaire aux vecteurs tri-AAV. Ces vecteurs AAV doubles ont été testés chez des souris mdx localement et par voie systémique avec des mini-gènes de la dystrophine [1]. Leur utilisation a permis de nettement améliorer l'histopathologie et le fonctionnement musculaire chez les souris mdx. Le transfert d'un mini-gène contenant le domaine R16/17 par des vecteurs AAV doubles a permis de restaurer correctement l'expression de la nNO synthase du sarcolemme et donc de diminuer l'ischémie associée à son déficit [1]. Cependant même si on s'approche plus d'une dystrophine de taille réelle et qu'on a donc plus de chances de retrouver un phénotype normal, on augmente considérablement la complexité de la méthode, pour acheminer le gène dans l'organisme, et donc le risque d'apparition de complications [114], [52]. Puis ce sont les micro-gènes, qui font environ un tiers de la séquence codante de la dystrophine (4kb), qui ont été testés avec les vecteurs AAV. Chez la souris l'utilisation de vecteurs AAV a permis le transfert de micro-gène à l'ensemble des muscles de l'organisme [1]. Le transfert des micro-gènes à l'aide de vecteurs AAV chez des chiens cDMD en 2007 est limité par une réponse immunologique marquée. Elle peut être bloquée brièvement par une immunosuppression transitoire [2].

Le traitement de l'atteinte cardiaque avec une micro-dystrophine ($\Delta R4-23/\Delta C$, figure 52) portée par un vecteur AAV a permis de restaurer le DGC au niveau du cœur et d'augmenter la solidité de la membrane des cardiomyocytes. D'autres études utilisant le même micro-gène ont permis de normaliser l'ECG et d'améliorer l'hémodynamique cardiaque chez de jeunes souris mdx, ainsi que chez des souris mdx adultes. Des souris femelles mdx âgées, pour lesquels l'atteinte cardiaque est déjà plus avancée, ont aussi été traitées avec le même micro-gène et on a pu observer son transfert à l'ensemble du cœur, malgré la forte fibrose cardiaque, montrant un potentiel thérapeutique du micro-gène pour le cœur [1]. Il faut noter que le vecteur joue un rôle essentiel, puisqu'il n'est pas évident de transduire le myocarde.

En effet, il existe plusieurs sérotypes du vecteur AAV et selon le sérotype, chaque vecteur AAV présente une préférence pour des types cellulaires particuliers, tout en étant capable d'infecter pratiquement tous les tissus (*tableau 9*). Même si les premiers essais cliniques ont été conduits avec des vecteurs AAV2, les nouveaux sérotypes plus efficaces tels que l'AAV8 ou l'AAV1 commencent rapidement à les supplanter [115].

Tableau 9 : Récepteurs/corécepteurs et préférences tissulaires de l'AAV [115].

Sérotype	Récepteurs primaires	Co-récepteurs	Tropisme tissulaires
AAV1	Acide sialique N-lié	Inconnu	MS, SNC, rétine, pancréas
AAV2	HSPG	FGFR1, HGFR, LamR, CD9 tétraspanine	MS, SNC, foie, reins
AAV3	HSPG	FGFR1, HGFR, LamR	Hépatocarcinome, MS
AAV4	Acide sialique O-lié	Inconnu	SNC, rétine
AAV5	Acide sialique N-lié	PDGFR	MS, SNC, poumons, rétine
AAV6	Acide sialique N-lié, HSPG	EGFR	MS, MS (i.v.), cœur, poumons
AAV7	Inconnu	Inconnu	MS, rétine, SNC
AAV8	Inconnu	LamR	foie, MS, SNC, rétine, pancréas, cœur
AAV9	Galactose N-lié	LamR	foie, cœur (i.v.), cerveau (i.v.), MS (i.v.), poumons, pancréas, reins (i.v.)

EGFR : epidermal growth factor receptor ; FGFR1 : fibroblast growth factor receptor 1 ; HGFR : hepatocyte growth factor receptor ; HSPG : heparan sulfate proteoglycan ; i.v. : injection intraveineuse ; MS : muscle squelettique ; PDGFR : palet-derived growth factor receptor ; SNC : système nerveux central.

De nouvelles capsides de vecteurs AAV sont à l'étude afin d'améliorer les performances lors de thérapie génique lors de myopathie de Duchenne et de Becker. Notamment des modifications génétiques de la capsid des vecteurs AAV est testée afin de modifier leur tropisme en les dirigeants vers certains récepteurs et types cellulaires. Le transfert de micro-gènes de la dystrophine par des vecteurs AAV est actuellement à la pointe du progrès de la thérapie génique pour la myopathie de Duchenne.

D. Traiter tous les muscles de l'organisme

Bien que la délivrance locale intramusculaire soit importante pour poser les bases de la thérapie génique, elle n'est pas adaptée pour traiter tous les muscles un par un. La myopathie de Duchenne affectant tous les muscles du corps, une unique thérapie par voie systémique serait l'idéal.

Peu d'études ont évalué l'administration intravasculaire de vecteurs AAV et le transfert de gène dans l'organisme entier chez les modèles comme les chiens cDMD. Lorsqu'on perfuse un mini-gène localement dans les membres de chiens cDMD, on observe une forte expression génétique de la mini-dystrophine dans tout l'organisme, qu'on suppose être due à des fuites au-delà du garrot [1]. Ces résultats ont motivé l'étude d'injections systémiques de gènes de mini-dystrophine via des vecteurs AAV chez des chiens cDMD de quelques mois. Les premiers résultats étaient prometteurs, puisqu'on a pu observer une expression génétique étendue et persistante chez un des chiens [116], [2].

Les premiers essais de délivrance de vecteurs par voie systémique ont utilisé des co-administrations d'agents tels que l'histamine, qui permet une vasodilatation et donc une meilleure perfusion des tissus. L'identification de nouveaux sérotypes des vecteurs AAV qui peuvent sortir de la

circulation sanguine et atteindre les cellules musculaires a permis le développement d'une délivrance systémique « vraie » (*tableau 9*) [16].

Ces premiers essais par voie systémique ont été effectués sur des souris mdx et d'autres modèles souris double-ko, en utilisant les vecteurs AAV-1, 6, 8 et 9, depuis 2004 [1], [100]. Des études ont même réussi l'administration systémique d'un vecteur AAV double [52]. L'utilisation de chiens cDMD nouveau-nés avec un système immunitaire immature, diminue la réponse immunitaire et permet une meilleure transduction du transgène [100].

Cette thérapie génique en injection systémique permet une nette amélioration des signes histologiques et physiologiques de la dystrophie musculaire, diminue la concentration en CK et augmente l'espérance de vie. Une étude chez des chiens cDMD a permis de montrer qu'une unique injection intraveineuse d'un vecteur AAV porteur d'un mini-gène humain de la dystrophine a engendré une transduction musculaire généralisée chez 15 à 100% des myofibrilles [110]. Cependant, ces chiots ont ensuite présenté des retards de croissance, ainsi qu'une atrophie et une contracture des muscles des membres pelviens, probablement dus à une réaction immunitaire exacerbée vis-à-vis de la mini-dystrophine humaine.

Au cours des dernières années, d'autres sérotypes des vecteurs AAV ont été testés et ont permis de constater que les vecteurs AAV-8 et Y445/ 731F AAV-1 étaient des vecteurs préférentiels pour un transfert de gène à l'ensemble de l'organisme (cœur et muscles squelettiques) chez des chiens nouveau-nés [100].

Le transfert des mini/micro-gènes et les mini/micro-gènes en soi sont améliorés en permanence, grâce aux études faites sur les souris mdx le plus souvent dans un premier temps. Même si pour l'instant chez l'homme les essais cliniques sont encore cantonnés à des injections locales en intramusculaire, les études de délivrance en systémique chez les modèles animaux et des essais cliniques chez l'homme de délivrance systémique pour d'autres dystrophies musculaires, (*étude en cours sur 9 enfants atteints d'atrophie musculaire spinale sévère, Dr Mendell 5 octobre 2015, international congress of the World Muscle Society*), sont très prometteuses.

III. La réparation du gène défectueux de la dystrophine

A. Les principes de la réparation du gène de la dystrophine

C'est en observant les différences phénotypiques chez les malades DMD/BMD et en se basant sur le fait que les mutations qui entraînent une dystrophine raccourcie mais fonctionnelle sont liées à des atteintes cliniques beaucoup moins sévères, qu'est venue l'idée d'une correction du gène. Le code génétique (3 nucléotides codent pour un codon) et le respect du cadre de lecture a fait penser qu'on pouvait changer une myopathie de Duchenne létale en une myopathie de Becker moins sévère. En effet, en agissant sur les nucléotides afin de modifier les codons, on peut ainsi transformer des codons stop en d'autres codons moins délétères et/ou restaurer le cadre de lecture en cas de délétion d'exon qui n'est pas un multiple de trois.

Basé sur cette théorie, le saut d'exons a été étudié dans un premier temps. Il s'agit de modifier l'épissage afin que certains exons/nucléotides (codons stop ou exons non multiples de 3) soient supprimés de l'ARNm. Cet ARNm modifié traduit produira ainsi une protéine déléetée en son sein, donc raccourcie comme c'est le cas chez les patients BMD, mais elle sera tout de même fonctionnelle, du fait de la restauration du cadre de lecture [100]. En effet, comme vu précédemment, certaines parties de la dystrophine ne sont pas essentielles à son fonctionnement et leur absence est peu délétère. Le saut d'exons doit cibler ces zones-là.

Contrairement aux thérapies essayant de remplacer le gène de la dystrophine, la modification des gènes déjà présents dans l'organisme, en les réparant, a des avantages immunologiques, puisque l'expression thérapeutique de ces gènes a beaucoup moins de risques d'induire des réactions immunitaires étant considérés comme faisant partie de soi. Cependant, un

aspect important est que les réparations nécessaires varient d'un patient à un autre, selon la mutation qui les affecte et qu'il faudra donc adapter ces réparations de gènes au cas par cas.

Les essais thérapeutiques pour corriger une mutation dans le gène de la dystrophine ont été menés sur l'ARN mais aussi sur l'ADN, en utilisant des oligonucléotides ou des endonucléases spécifiquement synthétisées à cet effet [1].

D'un côté le saut d'exons à l'aide des oligonucléotides antisens (AONs) en est déjà à la phase 3 des essais cliniques chez l'homme, tandis que de l'autre côté la réparation de gène directement sur l'ADN basée sur l'utilisation d'endonucléases en est à ses balbutiements.

B. La réparation de l'ARNm transcrit du gène défectueux de la dystrophine

1. Le saut d'exons

Le saut d'exons est fondé sur l'utilisation de petites séquences d'oligonucléotides antisens (AONs), acides nucléiques simple brin d'environ 25 paires de bases synthétisés artificiellement, capables de s'hybrider spécifiquement avec les ARN messagers. En effet, ces AONs bloquent la reconnaissance des motifs d'épissage de certains exons sur les ARN pré-messagers, ce qui conduit à l'épissage de ces exons avec les introns, ce qui résulte en une protéine dystrophine certes plus courte, mais partiellement voire totalement fonctionnelle [117].

Les premiers essais du saut d'exons ont été menés sur des cultures de cellules musculaires de souris mdx, à partir de 1998 et de chiens cDMD au début des années 2000 [1], [100]. L'utilisation de tissus de souris mdx a permis un bon monitoring de ces sauts d'exons et d'en étudier les effets thérapeutiques et secondaires avant de se lancer dans des études cliniques [12]. Le saut d'exons s'avérait aussi très efficace sur les cultures de cellules des chiens cDMD.

Des tests *in vivo* à partir des années 2000, sur des souris mdx et des chiens cDMD, ont montré que cette technique permet une restauration efficace de la synthèse de dystrophine et améliore la fonction musculaire, suite à une injection locale ou systémique [1], [100]. Les premières études sur le saut d'exon utilisaient les AONs appelés 2-O-méthyl phosphorothioate (2OMe-PS) ou phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMOs=morpholinos). Leur injection localement chez des chiens cDMD a permis le saut d'exons. L'inconvénient de l'utilisation du modèle canin cDMD est que les mutations qui l'affectent ne sont pas celles qui touchent la majorité des patients DMD. En effet, environ 60% des patients DMD hébergent des délétions parmi les exons 45 à 55 du gène DMD. Le saut de l'exon 51 a donc été testé chez des chiens cDMD. Il a permis de restaurer l'expression de la dystrophine et pourra donc être utile pour les patients présentant des délétions des exons 50, 52, des exons 48-50 ou des exons 49-50 entre autres. Le modèle canin cDMD constitue donc un modèle animal intéressant pour les essais précliniques sur le saut d'exons autour de l'exon 51 [59]. Par ailleurs, l'utilisation de PMOs pour traiter l'atteinte neurologique permet d'améliorer les fonctions de l'hippocampe chez la souris mdx. La réponse à la peur, facteur représentatif de l'atteinte du système nerveux central, lors de laquelle en tant que proie la souris se fige est également améliorée en injectant des PMOs aux ventricules du cerveau [1].

Le saut d'exons *in vivo* a aussi été testé chez le poisson-zèbre *Dmd* [42]. En effet, il constitue un modèle DMD *in vivo* tout à fait adapté à l'étude des conséquences fonctionnelles du saut d'exons. Le problème de réaliser les essais de saut d'exons chez l'homme est qu'il est difficile d'y évaluer les effets secondaires. Chez l'homme on ne peut réaliser que de petites biopsies, qui ne s'avèrent pas représentatives d'un point de vue statistique. De plus, il s'avère qu'il y a une grande disparité entre les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* lors du saut d'exons, indiquant qu'il est important d'établir des protocoles *in vivo*, ce qui est justement possible avec le modèle poisson-zèbre. Le poisson-zèbre a permis d'étudier la faisabilité et les caractéristiques du changement de phénotype par le saut d'exon. En effet, il faut que l'exon ciblé ne fasse pas partie d'une région essentielle au fonctionnement de la dystrophine. Or, chez le poisson-zèbre *Dmd*, la mutation de base *dmd*^{ta222a}, qui est à l'origine d'un codon stop causant la dystrophie musculaire, se trouve au sein d'un exon qui code pour une

calponine de la région N-terminale, qui s'avère être essentielle pour la liaison à l'actine. On ne pourrait donc pas enlever l'exon qui contient la mutation délétère sans enlever également le site qui code pour la calponine, engendrant un effet délétère, ce qui apporte une première limite au saut d'exons. D'autres modèles Dmd du poisson-zèbre ont donc été utilisés par la suite pour l'étude du saut d'exons.

La corrélation entre l'efficacité du saut d'exon et le niveau de rétablissement du phénotype sain, chez le poisson-zèbre Dmd, indique qu'il faut des niveaux de réussite de saut d'exons assez élevés pour permettre une amélioration thérapeutique significative. Les études permettent de mettre en place une banque de données sur le niveau de saut d'exon nécessaire pour induire une amélioration clinique significative. Les nouveaux mutants Dmd du modèle poisson-zèbre, avec des mutations hors zones essentielles du gène DMD, sont des modèles idéaux pour tester et monitorer le saut d'exons *in vivo*. Une étude a utilisé le modèle Dmd^{pc2}, en injectant aux embryons aux stades 1 à 2 cellules, une solution de PMOs à des concentrations différentes (figure 55).

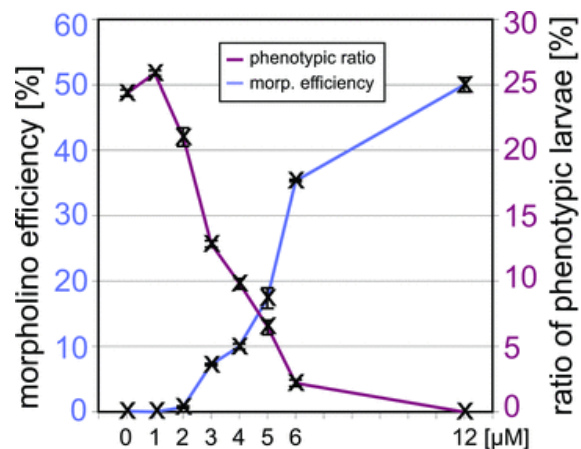


Figure 55 : Détermination d'un seuil d'efficacité de saut d'exon pour améliorer le phénotype de la maladie chez le poisson-zèbre Dmd. Différentes concentrations d'un mélange égal de deux PMOs (morpholinos) ont été injectées à des embryons hétérozygotes Dmd^{pc2} de poisson-zèbre. A trois jours post administration, les niveaux d'efficacité du saut d'exons ont été évalués (tracé bleu) par RT-PCR, et sont indiqués en pourcentage de transcrits pour lesquels le saut d'exons a marché sur tous les transcrits de la dystrophine. Le niveau d'amélioration phénotypique de la maladie correspondant, évalué par biréfringence, est indiqué par le pourcentage de larves ayant un phénotype dystrophique parmi toutes les larves qui ont été traitées (tracé violet) [42].

Cela a permis de montrer qu'une efficacité du saut d'exons de 20-30% est nécessaire pour induire une amélioration phénotypique significative de la maladie. En effet, lors d'une efficacité de saut d'exons d'environ 10%, on détecte encore 10% de poissons dystrophiques. Une efficacité de saut d'exons de 30-40% est suffisante pour permettre une disparition quasi-totale du phénotype dystrophique. Ce sont des chiffres qui se rapprochent assez bien des résultats obtenus notamment chez le modèle souris mdx [42].

Cependant, ces AONs présentent une pénétration tissulaire limitée et ne permettent pas d'atteindre le cœur, d'où le développement d'AONs conjugués, où les oligonucléotides sont liés par une liaison covalente à un peptide capable de pénétrer les cellules ou à un octa-guanidine dendrimer (ensemble appelé vivo-morpholino), pour améliorer la pénétration cellulaire. Leur administration systémique chez des souris mdx permet un saut d'exons efficace au niveau du cœur et de restaurer la fonction cardiaque [1]. En ce qui concerne les AONs conjugués, seulement les vivo-morpholinos ont été testés chez le modèle canin par injection locale. Comme espéré, cela a permis un saut d'exons solide et persistant [59].

Une autre limite à l'utilisation des AONs pour la thérapie génique est la demi-vie courte de ces oligonucléotides thérapeutiques. L'utilisation de vecteurs AAV permet une pénétration tissulaire efficace, ainsi qu'une production continue des AONs *in vivo* chez la souris mdx et le chien cDMD, même si les mêmes problèmes d'immunité se posent que pour le remplacement de gène. Leur utilisation a permis une nette amélioration du phénotype dystrophique chez des souris utrophine/dystrophine double-ko. L'utilisation des vecteurs AAV pour le saut d'exons a aussi permis d'améliorer de manière significative le phénotype dystrophique chez des chiens cDMD [1], [59]. L'injection d'AONs intégrés à des vecteurs AAV a été testée localement et par perfusion aux membres thoraciques chez six chiens de 5 à 15 mois, ainsi que par de multiples injections dans les muscles des membres pelviens de quatre chiots de 3 semaines [100]. Une restauration de l'expression de la dystrophine suffisante (20-80% de myofibres positives) a été obtenue jusqu'à plus de 10 mois après l'injection. Ce traitement a également permis de réduire le nombre de myofibres calcifiées et a permis d'améliorer les paramètres à l'IRM. De plus, la force musculaire a été améliorée chez les chiots traités [100]. Dans ces études, l'AON n'est pas un AON synthétique, mais est transcrit à partir d'un ARN nucléaire, dont la fonction naturelle est de participer à la maturation des ARNm, associé à un promoteur U7 ou U1 (snRNA U7, U1, small nuclear RNA), le tout véhiculé par un vecteur AAV pour que l'AON soit exprimé directement dans la cellule. La séquence antisens de l'AON est ainsi protégée de la dégradation et s'accumule dans le noyau où a lieu l'épissage. L'avantage par rapport à l'utilisation des AONs synthétiques est qu'il n'y a pas besoin d'injections répétées a priori, puisque cela permet une expression continue des AONs. Ces ARN nucléaires (snRNA) permettent de diriger l'AON de manière efficace vers le spliceosome dans le noyau et présente une affinité particulière pour les ARN pré-messagers. Le recours à ces petits ARN nucléaires pour véhiculer les séquences antisens et permettre le saut d'exons est très prometteur. Ils s'avèrent très efficaces chez la souris mdx et le chien cDMD, entre autres au niveau du cœur. Ils ont également été testés sur des cellules humaines et ont permis le saut de l'exon 51 et la restauration de l'expression de la dystrophine à des niveaux proches de ceux des personnes saines. Le traitement semble pérenne et non toxique. Cependant, l'introduction de ces snRNA antisens au cœur des fibres musculaires nécessite d'utiliser des vecteurs de gène en grande quantité [118], [119], [120].

Le saut d'exons multiples a également été essayé afin de pouvoir traiter plusieurs mutations en même temps. En effet, cela permettrait de développer une technique applicable à davantage de patients DMD (90%) [121], en effet la plupart des délétions par exemple se cantonnent à certaines régions du gène, et permettrait aussi de cibler certaines délétions en particulier qui optimisent la fonctionnalité de la dystrophine [122], [59]. Une injection d'un cocktail de dix AONs vivomorpholinos à des souris mdx52 a montré qu'un saut d'exons multiples, exons 45-55, est possible (*figure 56*). La protéine dystrophine $\Delta 45-55$, qui résulte de la traduction de l'ARNm modifié, s'est révélée protectrice et améliore significativement la force musculaire et l'atteinte histologique, sans aucun signe de toxicité associé [123]. Cette mutation est également retrouvée chez l'homme et le fonctionnement de ce saut multiple d'exons est un espoir.

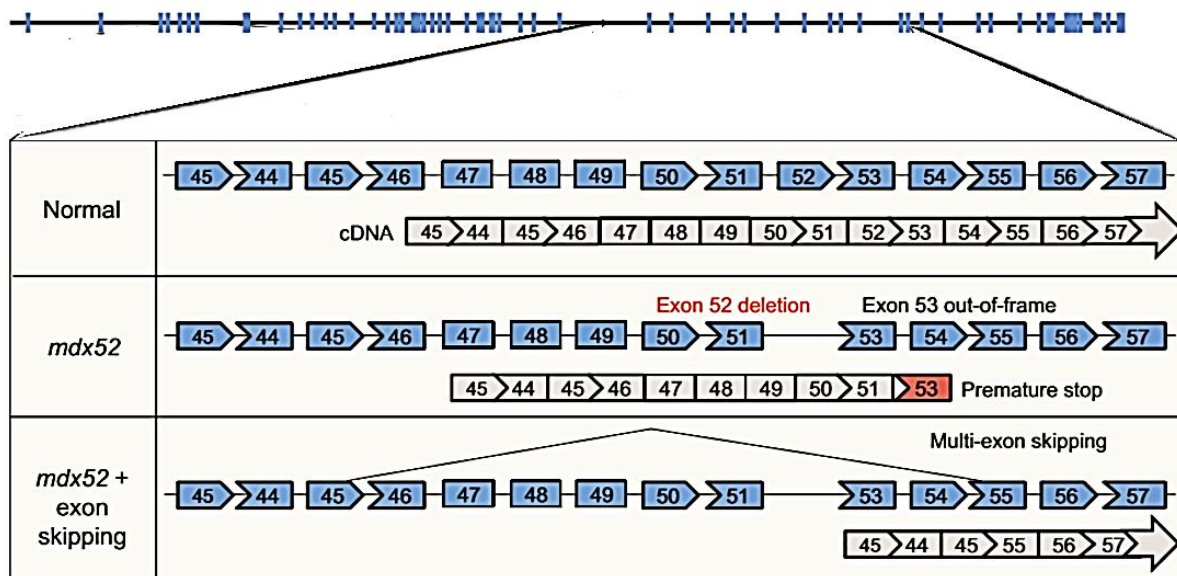


Figure 56 : Saut des exons 46 à 54 permettant de restaurer une dystrophine, raccourcie, mais fonctionnelle. En bleu les exons. En gris l'ADNc, simple brin artificiellement synthétisé à partir de l'ARNm, représentant ainsi la partie codante de la région du génome ayant été transcrite en cet ARNm. La souris mdx présente une délétion de l'exon 52 ce qui est à l'origine d'un codon stop prématuré et donc d'une protéine raccourcie et non fonctionnelle. Le saut des exons 46-54 permet de supprimer le codon stop, de restaurer le cadre de lecture et donc de synthétiser une protéine tronquée mais qui est fonctionnelle [1].

Chez le chien cDMD un cocktail d'AONs est nécessaire pour permettre un saut d'exons efficace dans les muscles *in vivo*, même si un unique AON semble suffisant pour engendrer le saut d'exons dans les myoblastes. Pour essayer de restaurer la dystrophine dans tout l'organisme, un cocktail de PMOs a été injecté à des chiens cDMD par voie intraveineuse. Ceci a en effet permis une expression diffuse de la dystrophine ainsi qu'une amélioration de la clinique. La dystrophine était exprimée autour de 26% par rapport au niveau normal. Les signes d'inflammation à l'IRM et à l'histologie étaient réduits et une amélioration était constatée lors des tests de déplacement. Les tests sanguins n'ont révélé aucune toxicité [122]. L'expression de la dystrophine est retrouvée dans tous les muscles squelettiques de l'organisme, à l'exception du cœur [59].

Malgré les résultats encourageants de certains essais cliniques, ces AONs existants présentent des limites. Leur niveau de toxicité reste parfois élevé et ils ne peuvent pas agir au niveau cardiaque ou passer la barrière hémato-méningée. La conception d'un traitement efficace simultanément pour l'ensemble de la musculature squelettique, le cœur et le système nerveux central reste encore un défi [117].

De nouveaux AONs ont été générés en 2015, les AON-tricyclo-DNA (AON-tcDNA) [117], [124], [125]. Ce sont des analogues synthétiques de l'ADN qui s'hybrident avec une très haute affinité avec les ARN pré-messagers cibles afin d'en moduler l'épissage et restaurer un cadre de lecture opérationnel. Le suivi de souris mdx traitées par ces AON-tcDNA montre qu'ils sont plus performants que leurs équivalents des générations précédentes. Administrés par voie intraveineuse, ils sont distribués efficacement à l'ensemble de la musculature squelettique. Ils atteignent aussi le tissu cardiaque et accèdent au système nerveux central, ce qui n'était pas le cas de leurs prédécesseurs. La restauration de la production de dystrophine est également plus efficace qu'avec les AONs précédents. Après une douzaine de semaines de traitement hebdomadaire, les souris présentent une amélioration très significative de la fonction musculaire, ainsi que des fonctions respiratoire et cardiaque, ce qui est important pour les patients DMD. Une correction des réponses émotionnelles naturellement exacerbées chez les sujets dystrophiques et pouvant entraîner des retards d'apprentissage et des défauts cognitifs a également été notée chez les souris mdx. Les problèmes

comportementaux observés lorsqu'il y a un déficit en protéine sont donc au moins partiellement réversibles chez la souris mdx adulte. Par ailleurs, les AON-tcDNA sont caractérisés par une longue persistance au sein des tissus ce qui permettrait à terme d'espacer les traitements. Autre avantage, ils ne sont pas dégradés mais évacués progressivement par l'organisme, permettant ainsi la réversibilité du traitement et limitant sa toxicité. Les analyses toxicologiques nécessaires sont toujours en cours mais les premiers résultats semblent en effet indiquer que ces nouveaux AONs sont bien tolérés à fortes doses chez la souris. Les mécanismes responsables de l'efficacité de ces AONs de troisième génération sont encore mal compris mais plusieurs de leurs propriétés pourraient entrer en jeu, notamment leur forte affinité pour l'ARN et leur capacité à former spontanément des agrégats de type « nanoparticules », supposés mimer l'effet de certains agents transfectants, ce qui facilite la pénétration dans les cellules. Cette technique est considérée comme l'une des stratégies thérapeutiques les plus prometteuses pour restaurer l'expression de la dystrophine au niveau du sarcolemme des muscles déficients en dystrophine.

2. L'Ataluren, une translecture de codons stop prématurés

L'Ataluren (Translarna™) est un produit de petit poids moléculaire, développé pour les malades atteints de myopathie de Duchenne par une mutation de type codon stop et qui a reçu l'AMM en 2014. En effet, environ 13% des patients DMD ont une mutation à l'origine d'un codon stop dans le gène de la dystrophine.

La translecture de codon stop est une technique innovante de chirurgie du gène. L'Ataluren est une molécule qui permet aux ribosomes d'ignorer exclusivement les codons stop prématurés consécutifs à une mutation ponctuelle lors de la traduction de l'ARNm, ce qui permet la production d'une protéine fonctionnelle. Le mode d'action de l'Ataluren reste mal caractérisé, en particulier sa cible moléculaire n'a pas encore été décrite. Les résultats des essais cliniques indiquent un ralentissement de l'évolution de la maladie ainsi que l'amélioration de la marche pour certains malades [126].

Des études de l'Ataluren sur le poisson-zèbre montrent des effets bénéfiques à la concentration optimale de 0,5µM sur la fonction contractile, associé à une structure musculaire améliorée et une augmentation de l'expression de la dystrophine [127]. L'amélioration significative de la fonction musculaire est notée à partir du 2^e jour de traitement à l'Ataluren pour des concentrations allant de 0,1 à 1 µM.

Cette dose optimale de 0,5 µM correspond aux résultats obtenus sur des cultures cellulaires et avec la souris mdx [128]. Le traitement à l'Ataluren par voie orale et intrapéritonéale de la souris mdx pendant 4 mois, permet d'améliorer le phénotype dystrophique des muscles, comparé aux contrôles négatif et positif. L'immunohistochimie de coupes transversales de muscles permet de visualiser une expression de la dystrophine après traitement dans le tibialis anterior, le diaphragme, et le cœur chez les souris traitées à l'Ataluren comparé aux contrôles mdx négatifs [116].

Il est intéressant de noter que chez le poisson-zèbre la courbe dose-effets est en forme de cloche, et qu'à des concentrations d'Ataluren plus élevées les effets diminuent, voire ont un effet négatif sur la force musculaire. Ces résultats ont été retrouvés chez l'homme lors des essais cliniques de phase 2b [126], où l'on pouvait observer une amélioration de la distance parcourue lors du test de marche de 6 minutes à des doses faibles, mais pas à des doses plus fortes.

D'après l'avis du 21 janvier 2015 de la haute autorité de la santé, les données disponibles suggèrent un bénéfice potentiel, mal démontré et modeste, en termes de ralentissement de la perte de la marche chez certains enfants atteints de myopathie de Duchenne, avec une tolérance acceptable. L'efficacité n'a pas été démontrée chez les patients ayant perdu la fonction de marche.

C. La réparation du gène défectueux de la dystrophine directement sur l'ADN

Contrairement à la méthode du saut d'exons, qui agit au niveau de l'ARN pré-messager, les techniques cherchant à corriger le gène même de la dystrophine sont moins développées.

Les premières techniques, à la fin des années 1990, consistaient en l'utilisation de techniques de recombinaisons homologues. Cependant, le taux de ces recombinaisons homologues était faible et celui des recombinaisons non homologues élevé. Cela a rapidement mené à utiliser plutôt des oligonucléotides, petites séquences d'ADN ou d'ARN, homologues à l'ADN cible contenant la mutation délétère. Ce système est proche de celui utilisant les AONs lors du saut d'exons, mais repose sur les mécanismes de réparation de la cellule et responsables de l'intégrité des chromosomes. Ce processus nécessite de nombreuses étapes comme la synthèse des oligonucléotides complémentaires à l'ADN au niveau de la mutation, la reconnaissance de cette mutation, son excision, puis l'insertion des nucléotides voulus. De nombreux essais *in vitro* sur des cultures de cellules ont été concluants. Cela a permis de corriger le gène chez des souris mdx et mdx5cv, avec une expression de la dystrophine dans sa totalité persistant plus de quatre mois. La correction de la mutation sur des cellules souches *ex vivo* avant de les réinjecter a aussi été testée chez le modèle souris mdx et s'est avérée efficace. En effet, on recherche dans ce cas à ce que les cellules souches transmettent ensuite la correction à leurs cellules filles. De plus, cela permet un meilleur contrôle des cellules et de diminuer le risque chez les patients de transmettre des mutations non voulues, risque présent lors de traitements *in vivo*. Des essais chez le modèle cDMD ont montré la possibilité de son utilisation chez des modèles plus grands. Une étude a testé un oligonucléotide chimérique ARN/ADN sur un chiot cDMD de 6 semaines et une correction du gène persistant plus d'un an après le traitement a été mise en évidence [100]. Le but a été de rendre les oligonucléotides plus stables et plus résistants. Des nucléotides simple-brin de 12-18 nucléotides sont suffisants pour engendrer une liaison forte avec l'ADN. Mais l'efficacité de cette méthode s'est avérée trop faible pour son utilisation clinique. De plus, il faut adapter les oligonucléotides à chaque mutation différente [129], [1].

Une autre technique beaucoup plus puissante pour corriger l'ADN consiste en une correction de la mutation du gène à l'aide de nucléases, développées les dix dernières années, et qui vont agir comme une paire de ciseaux à l'endroit voulu de l'ADN, afin de découper la partie du gène défectueuse. Puis la brèche double brin de l'ADN est corrigée par les mécanismes cellulaires. Des insertions et/ou des délétions peuvent se produire à l'endroit de la brèche. Dans certains cas le changement restaure la séquence d'origine qui code pour la dystrophine fonctionnelle, si on fournit en parallèle la séquence correcte. Dans d'autres cas les mécanismes de réparation cellulaire remplacent au moins la mutation délétère par une autre mutation qui l'est moins. Quatre familles de nucléases ont été développées récemment, la meganucléase (MNs), la nucléase doigt de zinc (ZFNs), la TALEN (transcription activator-like effector nuclease) et le système CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated nuclease/helicase) (figure 57). Toutes ont été testées chez divers modèles animaux, drosophile, *C. elegans*, souris, rat, poisson-zèbre, pour le traitement de la myopathie de Duchenne, mais la plupart des études se cantonnent encore aux cultures cellulaires, notamment chez l'homme [1], [129].

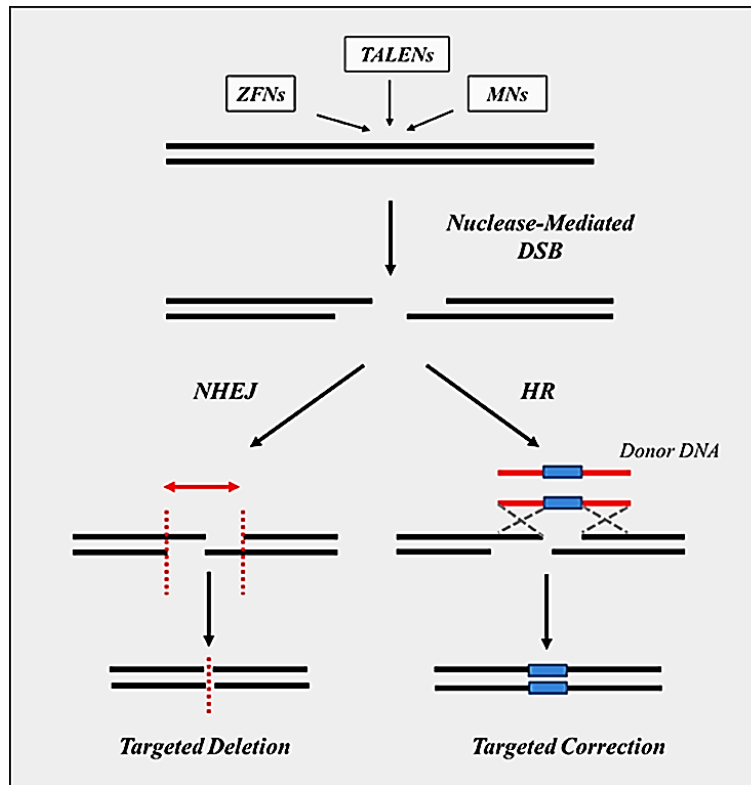


Figure 57 : La correction de gènes par les nucléases. Après la pénétration dans la cellule de la nucléase et la reconnaissance de la région de l'ADN ciblée pour la réparation, une coupure double-brin de l'ADN (DSB, double-strand break) est générée, ce qui entraîne l'activation de mécanismes de réparation spécifiques. En cas d'absence de séquences d'ADN, la coupure est corrigée par recombinaison non homologue des extrémités (NHEJ, non-homologous end-joining) de part et d'autre de la coupure, avec une excision des séquences non compatibles qui dépassent et l'assemblage des extrémités de la séquence excisée, à l'origine d'une délétion ciblée de la mutation. Cette délétion concerne en général une ou plusieurs bases. Cette délétion entraîne soit l'inactivation du gène ou alors la restauration du cadre de lecture du gène à l'origine de protéines raccourcies mais fonctionnelles. L'introduction de nucléotides peut également s'effectuer lorsqu'on a une séquence d'ADN donneuse, qui contient la séquence voulue ciblée sur la mutation. Le principe repose sur la recombinaison homologue (HR) [129].

Certains problèmes persistent encore. En effet, le niveau de correction du gène reste encore faible dans les cellules. De plus, la synthèse des nucléases *in vitro* s'avère difficile et demande du temps. L'utilisation de vecteurs viraux ou de plasmides est nécessaire pour assurer une forte expression des nucléases dans le noyau, avec cependant l'augmentation du risque de mutations dans d'autres gènes.

La technologie CRISPR/Cas9 est une technique récemment mise au point (2013) pour corriger un gène défectueux et s'avère être une bonne alternative aux autres nucléases. Son système provient du mécanisme de défense de la bactérie *Staphylococcus aureus* contre les virus. Il permet de couper le génome à un endroit voulu à l'aide d'ARN guides dont les séquences sont complémentaires de l'ADN ciblé (figure 58). Cette technique a déjà permis de restaurer l'expression de la dystrophine dans des cellules musculaires isolées de patients DMD [130]. Elle a également permis de corriger des mutations de type duplication dans des cellules musculaires chez des patients DMD. Une question importante est tout de même soulevée. Peut-on reproduire dans un muscle vivant ce qui a été fait sur des cultures cellulaires ? C'est dans cette optique que dans un premier temps la thérapie CRISPR/Cas 9 a été testée sur les muscles de souris mdx, avec des résultats prometteurs [131], [132]. En effet, le traitement avec CRISPR/Cas9 permet de nettement réduire le phénotype dystrophique et d'améliorer la contractilité musculaire.

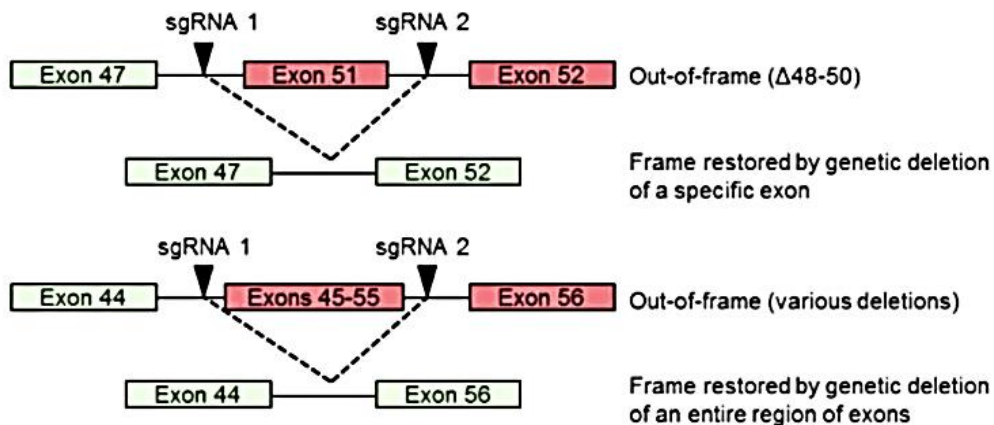


Figure 58 : La correction d'un gène à l'aide de la technique CRISPR/Cas9. Synthèse d'ARN guides (sgRNA) qui ciblent la proximité de la mutation et se lient à des introns, pour éliminer un ou plusieurs exons. Leur excision puis la recombinaison non homologe des extrémités générées permet de restaurer un cadre de lecture correct [130].

Cependant, malgré ces progrès encourageants il faut rester méfiant, puisque c'est une technique qui n'en est encore qu'à ses débuts. Il reste encore beaucoup de travail avant de pouvoir espérer la tester chez des patients humains, notamment à cause de la réponse immunitaire qu'engendre la protéine Cas9 dérivée de la bactérie *S. aureus* et à cause de fixations erratiques, éliminant certaines zones du génome, qui ne devraient pas être éliminées [16].

IV. La thérapie génique indépendante du gène de la dystrophine

A. Utilisation du gène de l'utrophine et de l'intégrine

Comme vu précédemment, la thérapie génique peut être classée en deux grands domaines, celle dépendant du gène responsable de la maladie et celle indépendante du gène de la maladie. Ces dernières sont dirigées vers des substituts fonctionnels du gène atteint ou concerne des gènes qui interviennent en aval du processus, comme c'est le cas de l'utrophine ou de la follistatine lors de myopathie de Duchenne [16].

L'utrophine et l'intégrine ont des fonctions très proches de la dystrophine et sont surexprimées chez les souris mdx, où elles améliorent la symptomatologie de la myopathie. Des études de thérapie génique ont été menées chez des souris mdx en utilisant l'utrophine dans sa totalité, des mini-utrophines, des micro-utrophines, ainsi que l' $\alpha 7$ -intégrine, avec les mêmes principes que pour la dystrophine, les mini et micro-dystrophines. Et comme attendu, le phénotype dystrophique en a été nettement amélioré. Ces essais de thérapie génique utilisant l'utrophine et l'intégrine ont également été menés chez des chiens cDMD et ont permis de montrer une nette amélioration de la maladie. En effet, une mini-utrophine $\Delta 17-48$ a été injectée à l'aide d'un adénovirus à des chiots cDMD de 2 jours immuno-déprimés et a permis une transduction s'élevant à 15%, entraînant une nette réduction de la fibrose deux mois après le traitement [1]. Une micro-utrophine a également été générée et son utilisation chez des souris dystrophine/utrophine double-ko a permis d'augmenter leur espérance de vie et d'améliorer leur fonction musculaire. Son effet thérapeutique reste à être évalué chez des chiens cDMD. Le remplacement de la dystrophine manquante par l'utrophine a également été étudié dans le cerveau. Cependant, une étude de 2012 suggère qu'une surexpression de l'utrophine dans le cerveau n'améliore pas les problèmes comportementaux chez la souris mdx [1].

Une des différences entre les protéines structurales des patients DMD et des souris mdx est la présence d'utrophine. L'utrophine présente 80% de similarité avec la dystrophine et possède beaucoup de ressemblances structurales et fonctionnelles avec elle. L'utrophine peut donc interagir avec les mêmes protéines que la dystrophine. En temps normal, quand la dystrophine est exprimée, l'utrophine est sous-exprimée dans les muscles adultes et se restreint aux jonctions myotendineuses et neuromusculaires. Cependant, quand la dystrophine est absente, l'utrophine est capable de restaurer la fonction stabilisante de la dystrophine et aide à préserver la fonction musculaire. Chez la souris mdx la surexpression de l'utrophine permet de restaurer l'intégrité de la membrane plasmique et de protéger contre la dégénérescence musculaire, tandis que chez les patients DMD, même si l'utrophine est surexprimée et redistribuée vers le sarcolemme, le niveau d'expression de l'utrophine n'est pas suffisamment élevé pour prévenir la progression de la maladie. C'est donc l'expression de fibres révertantes et la surexpression compensatoire de l'utrophine qui fait que chez la souris mdx le phénotype de la maladie est moins sévère que chez l'homme [12].

L'utrophine étant une protéine endogène, augmenter sa synthèse n'entraîne pas de rejet, contrairement à la dystrophine qui n'est pas considérée comme appartenant à soi chez les patients DMD et entraîne donc des réactions immunitaires [22]. De plus, l'utrophine est indépendante de la mutation présente dans le gène de la dystrophine et son utilisation pourrait donc concerner la totalité des patients DMD.

B. Utilisation du gène SERCA (Sarco/endoplasmique reticulum calcium ATPase)

Lors de myopathie de Duchenne et de Becker, une des principales conséquences de l'absence ou de manque de dystrophine est une augmentation de calcium dans le cytoplasme des cellules musculaires, notamment par un dysfonctionnement de la pompe SERCA, qui est la pompe à calcium qui fait sortir le calcium des cellules musculaires. Or, un calcium cytosolique élevé favorise la protéolyse et la mort cellulaire. Une des stratégies serait donc de réduire la quantité de calcium intracellulaire et de rétablir l'homéostasie calcique afin de réduire l'atteinte musculaire. Il a donc été essayé de délivrer le gène SERCA à l'aide de vecteurs AAV afin de voir si cela permettait d'améliorer la dystrophie musculaire chez les modèles animaux dans un premier temps. L'injection intraveineuse d'un vecteur AAV transportant le gène SERCA à des souris mdx a permis d'augmenter de manière significative la force des muscles squelettiques et la fonction cardiaque. Il reste à tester cette approche sur des modèles plus grands tels que le modèle cDMD [16].

Par ailleurs, comme pour l'utrophine, la thérapie génique avec le gène SERCA ne devrait pas entraîner de réactions immunitaires à son encontre, la pompe SERCA existant déjà dans l'organisme des patients DMD.

C. Utilisation du gène Galgt2

Le gène Galgt2 code pour une enzyme localisée à la jonction neuromusculaire et impliquée dans le transfert de sucres (glycosylation) sur des molécules comme la dystroglycane. Des travaux réalisés sur des modèles de souris et de grand singe ont montré que la surexpression de Galgt2 stimule l'expression de la dystrophine et améliore les manifestations de la maladie. Un essai de thérapie génique pour apporter le gène Galgt2 est en préparation aux États-Unis [133].

V. La thérapie génique chez l'homme suite aux résultats obtenus sur les modèles animaux

Le passage des modèles animaux à l'homme pour la thérapie génique est un défi. En effet, on observe des problèmes de pureté des vecteurs, de procédures de sécurité, de dose des vecteurs, de réponse de l'hôte, de métabolisme et de poids de l'hôte, et ainsi de suite. Problèmes auxquels on a déjà été confrontés lors du passage des petits modèles comme la souris mdx, à des modèles plus grands tels que le chien cDMD. C'est en s'approchant de plus en plus de modèles proches de l'homme et ayant une présentation clinique la plus similaire possible qu'on essaye de palier à ces problèmes.

A côté de cela, des études observationnelles et la création de banques (Banque de données UMD-DMD France) et bases de données (Base de données TRAE-T-NMD DMD) qui permettent de mieux comprendre la maladie, d'identifier de meilleurs outils diagnostiques ou de suivi, ou encore d'étudier l'effet d'un traitement à long terme, en passant plus ou moins par des études sur des modèles animaux au préalable.

Les essais cliniques consistent à évaluer les effets d'un traitement potentiel dans le but de s'assurer qu'il est bien toléré et efficace. Plusieurs essais cliniques ont été débutés suite aux résultats obtenus avec les animaux modèles de la myopathie de Duchenne et de Becker [Annexe 2] [16].

Le premier essai clinique pour la dystrophie musculaire a été publié en 2004, lors duquel un vecteur non viral, un plasmide, appelé Myodys a été utilisé. Il permettait la libération d'une séquence codante pour la dystrophine en entier. Ce plasmide a été injecté directement dans le muscle de patients DMD. Malheureusement, cette thérapie a mené à une expression de la dystrophine minime.

Le premier essai avec des vecteurs AAV pour la myopathie de Duchenne a été rapporté en 2010. Lors de cet essai un vecteur hybride AAV-2/5 transportant un gène de la dystrophine raccourci a été utilisé. Cependant, l'expression de la dystrophine s'est avérée très faible dans les muscles injectés, ce manque d'expression de la dystrophine étant sûrement lié à la réponse immunitaire des patients.

Le premier essai de saut d'exons chez des patients DMD a été publié en 2007. Lors de cet essai clinique, des AONs ont été directement injectés dans des muscles de patients DMD. Depuis, de nombreux progrès ont été effectués et plusieurs essais cliniques ont été menés en Europe et aux Etats-Unis afin d'arriver à une injection systémique pour pouvoir traiter par saut d'exons tous les muscles à la fois. Les principaux problèmes avec le saut d'exons actuellement sont la faible efficacité, l'effet transitoire, et l'incapacité à atteindre le cœur. La FDA (US Food and Drug Administration) a récemment étudié deux médicaments destinés au saut d'exons, l'un de BioMarin Pharmaceutical (Kyndrisa; drisapersen) et l'autre de Sarepta Therapeutics (eteplirsén; AVI-4658). Les deux sont destinés à générer l'exclusion de l'exon 51 qui pourrait être bénéfique à ~13% des patients DMD. Malheureusement ils manquent d'efficacité et il est impossible de montrer une augmentation d'expression de la dystrophine par Western blot. De plus, ils présentent certains risques d'effets secondaires, tels qu'une toxicité rénale.

De multiples essais cliniques ont été menés suite aux phases précliniques et se trouvent actuellement à des phases d'essais différentes (tableau10), [Annexe 2] [133].

Tableau 10 : Essais cliniques chez l'homme pour la thérapie génique dans le cadre des myopathies de Duchenne et de Becker, [133].

Méthode		Maladie	Phase d'essai	Résultats
Thérapie génique	Gène d'une micro-dystrophine (IM) (<i>rAAVrh74.MCK.Micro-Dystrophine</i>)	DMD	I	en cours
	Gène de la follistatine (IM) (<i>rAAV1.CMV.huFollistatin344</i>)	BMD/ DMD	I/II	en cours
	Gène GALGLT2 (IM) (<i>rAAVrh74.MCK.GALGT2</i>)	DMD	I	en préparation
Saut d'exons	Drisapersen (exon 51)			AMM refusé - manque d'efficacité (14/01/16) - Abandon
	PRO044 (exon 44)			Abandon
	PRO045 (exon 45)			Abandon
	PRO053 (exon 53)			Abandon
	Eteplirsén (exon 51)	DMD	II/ III	en cours
	SRP-4053 (exon 53)	DMD	I/II	en cours
SRP-4045 (exon 45)	DMD	I/II	en cours	
Translecture de codon stop	Ataluren (ou PTC124 ou Translarna™)	DMD/ BMD	III	améliorations significatives
	NPC-14	DMD	II	en cours

Troisième partie : Les autres thérapies développées grâce aux modèles animaux

I. Des thérapies qui s'attaquent aux conséquences cliniques des myopathies de Duchenne et de Becker

D'autres thérapies ont été développées et sont en cours de développement, le temps que la thérapie génique soit mise au point. Elles s'attaquent aux symptômes liés aux myopathies de Duchenne et de Becker et tentent de limiter le plus possible la progression de la maladie. Il ne s'agit donc pas de traiter la maladie en elle-même, qui est un manque de dystrophine, mais de traiter tout ce qui découle de cette absence/manque de dystrophine.

Différentes stratégies ont été élaborées. La thérapie cellulaire permet de palier à la dégénérescence des fibres musculaires par l'apport de nouvelles cellules musculaires. L'utilisation d'anti-protéases, de facteurs de croissance, d'inhibiteurs de canaux calciques, de donneurs d'oxyde nitrique (NO) permettent de réduire la destruction des fibres musculaires. De plus, il est aussi possible de réduire la fibrose à l'aide d'anti-fibrotiques. Par ailleurs, la perte de la masse musculaire peut être compensée à l'aide des anti-myostatines et la force musculaire peut être améliorée à l'aide des inhibiteurs de l'enzyme de conversion. Il s'agit aussi de soutenir les autres organes atteints tels que le cœur, en protégeant la fonction cardiaque avec les médicaments de l'insuffisance cardiaque...

En effet, l'utilisation d'IECA (inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine) notamment, induit une vasodilatation et réduit la quantité d'angiotensine II, impliquée dans le processus inflammatoire [12]. Des résultats encourageants ont été obtenus chez la souris mdx et ils augmentent le taux de survie des patients DMD.

De plus, une piste intéressante, alternative à la thérapie génique, est l'identification de modificateurs génétiques. En effet, plusieurs gènes candidats dont l'expression pourrait être modulée avec ces modificateurs génétiques s'avèrent être très prometteurs. Il s'agit de la surexpression de la follistatine, du facteur de croissance insuline-like 1, de la cytidine monophosphate-sialic acid hydroxylase (CMAH), de l'ATPase calcique du réticulum sarcoplasmique ou de la sous-expression de la myostatine, de l'ostéopontine, de la cyclophiline D, de l'histone deacetylase entre autres, qui diminuent le phénotype dystrophique chez les modèles animaux DMD. Le fait de cibler ces gènes alternatifs pourrait s'ajouter aux thérapies de remplacement/ réparation du gène de la dystrophine [52].

Lors de ces essais précliniques, on a tendance à passer directement des études sur la souris mdx aux études sur l'homme. Le modèle canin cDMD a moins été utilisé pour les études pharmacologiques, peut-être à cause d'un risque perçu comme étant moins important que lors de la thérapie génique [2].

Le poisson-zèbre constitue un excellent modèle pour l'étude de la myopathie de Duchenne et de Becker. En effet, il permet de réaliser un criblage rapide, facile et peu onéreux de petites molécules qui pourraient améliorer les atteintes musculaires chez la larve dystrophique et d'améliorer la fonction musculaire déjà présente au moment de l'éclosion (*figure 59*). Le poisson-zèbre s'avère donc prometteur dans la recherche de traitements notamment pharmacologiques. Il a permis entre autres d'identifier 7 molécules qui préservent de l'apparition d'une structure anormale dans les muscles des poissons déficients en dystrophine (*tableau 11*). Ces poissons ont présenté un phénotype normal, sans que l'expression de la dystrophine soit restaurée. Il est supposé que ces molécules agissent sur d'autres protéines que la dystrophine, ce qui ouvre sur de nouvelles issues thérapeutiques [134].

Cette recherche de molécules pharmacologiques se fait aussi bien avec la drosophile, les résultats devant ensuite être transcrits chez la souris puis chez l'homme [135].

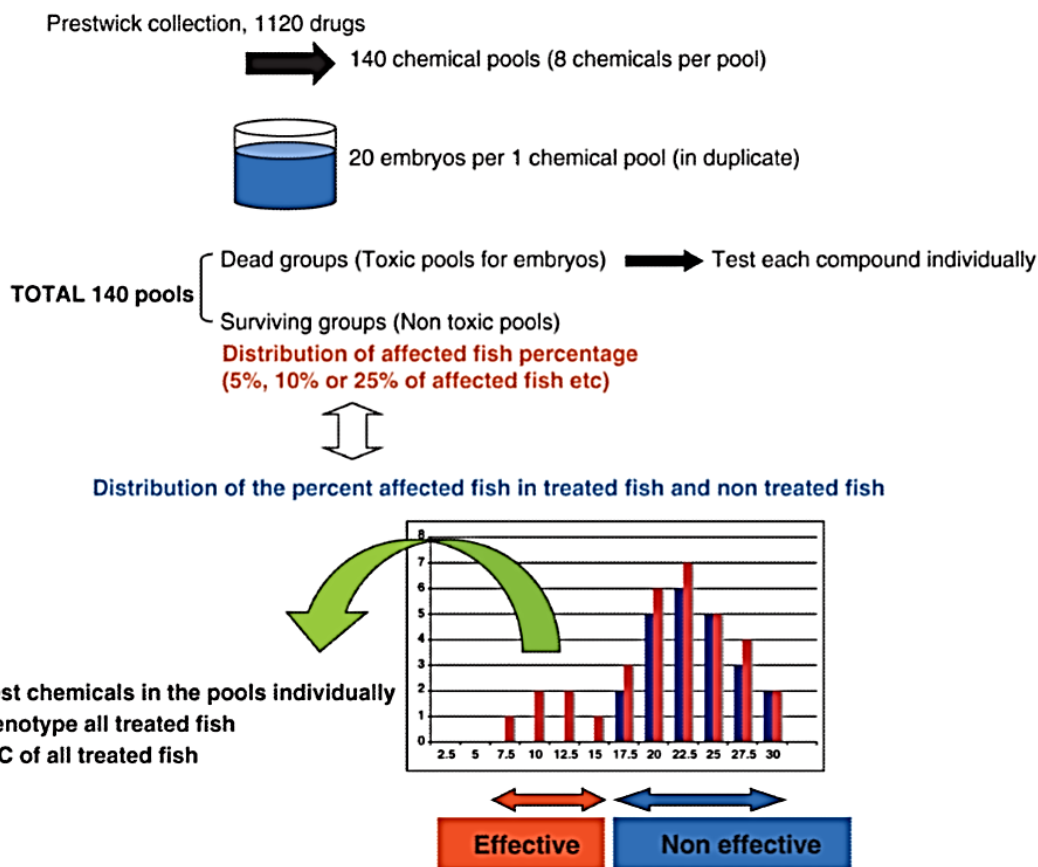


Figure 59 : Schéma de la recherche de molécules pharmacologiques ('drug screening') pour la myopathie de Duchenne et de Becker à l'aide du modèle poisson-zèbre Dmd. 1120 molécules ayant un potentiel d'intérêt dans le traitement des myopathies de Duchenne et de Becker sont sélectionnées au début. Leur effet par groupe de 8 molécules est testé sur des embryons de poissons-zèbre Dmd. Dans les groupes à effet toxique les molécules sont testées individuellement pour déceler celles qui sont toxiques et les écarter. Parmi les molécules sans effet toxique on recherche celles qui ont un effet significatif, pour en faire par la suite des molécules dont on étudiera de plus près le mode d'action, [134].

Tableau 11 : Molécules candidates qui pourraient avoir un effet bénéfique sur l'absence de dystrophine, testées sur des poissons-zèbres Dmd (sapje et sapje-like). Différents agents sont testés, comme des anti-inflammatoires, des anti-allergiques, des inhibiteurs non sélectifs de phosphodiésterases (PDE), des stéroïdes, des agents chélateurs ou des agents cardiotoniques. On observe ensuite le taux de survie des poissons à 30 jours post fécondation (dpf) et on retient les molécules qui ont permis d'améliorer l'espérance de vie, [134].

Candidate Chemicals	Sapje (%)	Sapje-like (%)		The average number of surviving fish at 30 dpf (n = 3,10 fish)
Epirizole	10	15	Anti-inflammatory agent	3.67
Homochlorcyclizine dihydrochloride	10	12.5	Anti-allergic agent	0
Conessine	10	12.5	Anti-allergic agent	0
Aminophylline	7.5	17.5	A non selective PDE inhibitor	5.33
Equilin	5	10	A group of steroid compounds	2.33
Pentetic acid	7.5	10	Chelating agents	4.00
Proscillaridin A	10	10	Cardiotonic agents	0

Ces tests *in vivo* s'avèrent indispensables, puisqu'on observe souvent des cas de molécules qui sont intéressantes sur des cultures de cellules de mammifères, mais qui lors des tests sur des rongeurs par exemple se révèlent être toxiques. La drosophile Dmd semble très utile pour l'obtention immédiate de "molécules de haute qualité", puisque les études *in vivo* permettent directement d'évaluer la toxicité, ainsi que l'effet thérapeutique des molécules sur le phénotype de la maladie. En effet, il n'y a pas de modèle DMD *in vitro* qui regroupe suffisamment de caractéristiques de la maladie et qui puisse être utilisé pour des études de screening de molécules.

II. Réduction de l'inflammation

A. L'inflammation dans le cadre de la myopathie de Duchenne

L'inflammation est la caractéristique finale au niveau des muscles, commune lors de dystrophinopathies, et qui est flagrante lors de myopathie de Duchenne et de Becker, avec des niveaux élevés en cytokines et l'activation de chémokines, l'adhésion de leucocytes et l'activation du système du complément. En effet, des études extensives sur l'expression des gènes comparant la souris mdx aux patients DMD ont été effectuées [12].

On peut prendre l'exemple du modèle poisson-zèbre Dmd, où l'on met en évidence une inflammation qui se met en place au cours de l'évolution de la myopathie. Les muscles des larves homozygotes $Dmd^{ta222a/ta222a}$ âgés de 28 jours post-fécondation (dpf) montrent la présence de nombreux neutrophiles, caractérisés par leurs granules denses aux électrons et un noyau excentré (*figure 60*). Des neutrophiles en amas ont également été retrouvés, ce qui signe une inflammation aiguë.

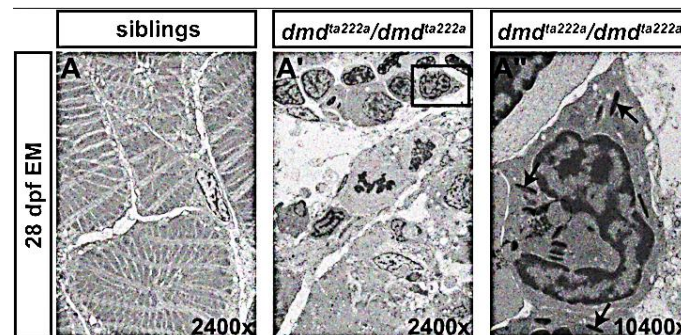


Figure 60 : Inflammation chez des poissons-zèbre déficients en dystrophine. Les neutrophiles identifiés par leurs granules denses aux électrons (flèche), n'ont pas été détectés chez les individus sains (siblings) (A). On retrouve de manière fréquente des neutrophiles dans les muscles des homozygotes $dmd^{ta222a/ta222a}$ (A'), certains étant regroupés en amas indiquant une inflammation aiguë. (n=4 avec 4 coupes par larve). Zoom de l'encadré en A', (A'') [41].

Par ailleurs, il semblerait qu'il y ait un lien entre l'inflammation et les affections de l'humeur, tels que les états dépressifs que l'on peut noter lors des myopathies de Duchenne et de Becker. Donc comme pour d'autres maladies inflammatoires, le traitement de l'inflammation pourrait être bénéfique pour l'état moral des patients DMD. Inversement, l'action sur les désordres d'humeur et sur la dépression pourrait avoir un effet bénéfique sur la régulation de l'inflammation [12]. En effet, étant donné qu'on connaît bien la comorbidité de la dépression chez d'autres maladies inflammatoires, il n'est pas très étonnant que la dépression soit aussi prévalente chez les patients DMD. De plus, on sait que le stress contribue directement à l'inflammation par une sécrétion augmentée et une activation des cytokines, des leucocytes, des cellules natural killer, des lymphocytes T-CD8, ainsi que des lymphocytes B.

Les études pour réduire cette inflammation ont largement utilisé le modèle souris mdx. Des changements dans les profils des cytokines pro-inflammatoires ont pu être mis en évidence, tels que le facteur de nécrose tumorale (TNF), l'interleukine (IL)-1 et l'interleukine (IL)-6 qu'on détecte tôt au cours de la maladie. Cette réponse inflammatoire s'aggrave au cours de l'évolution de la maladie.

B. L'utilisation des corticostéroïdes, effet anti-inflammatoire mais pas seulement

Des stéroïdes tels que la prednisolone, la prednisone ou le deflazacort, un dérivé de la prednisolone, sont souvent prescrits aux patients DMD. Il s'agit jusqu'à présent du seul traitement pharmacologique efficace pour ralentir la progression de la maladie, bien qu'ils soient associés à des effets secondaires tels que des symptômes gastro-intestinaux, des désordres métaboliques et nutritionnels, des perturbations du système nerveux central et périphérique et des désordres psychiques [12], [1], indiquant que des stratégies thérapeutiques plus adaptées seraient préférables.

Le mécanisme d'action de ces molécules a été étudié chez la souris mdx. La prednisone et la prednisolone ont des effets anti-inflammatoires évidents tels qu'une réduction de l'expression des macrophages, des lymphocytes (CD4+ et CD8+) et des éosinophiles dans les muscles squelettiques. La prednisolone permet d'augmenter la force des muscles squelettiques et de retarder la perte de force de contraction des membres thoraciques. Elle n'a pas d'influence cependant sur la régénération des fibres musculaires. L'espérance de vie est augmentée sous prednisolone, même si on ne peut pas directement transcrire cette observation à l'homme, leur physiopathologie n'étant pas la même sur ce point. Le deflazacort permet de stimuler la réparation myogénique et la différenciation musculaire et atténue donc aussi la pathologie musculaire [12]. L'effet thérapeutique bénéfique de la prednisone a pu être mis en évidence chez le chien cDMD. En effet, un traitement oral journalier *per os* avec de la prednisone sur 4 mois permet une amélioration fonctionnelle et histopathologique de la myopathie. Cependant, une augmentation de la calcification des myofibres et une diminution de l'expression de la myosine suggèrent de possibles effets délétères de ce traitement [136]. En effet, une étude de longue durée (100 jours) sur le traitement stéroïdien chez la souris mdx montre l'apparition d'une fibrose cardiaque, associée à un cœur qui se fragilise, avec des résultats similaires observés au niveau des muscles squelettiques. Ces résultats incitent à la prudence bien que le modèle souris mdx ne soit pas un modèle approprié comme contrôle positif lors d'études sur le long terme de par sa physiopathologie.

Dans une étude en aveugle d'environ 100 molécules à cibles très diverses, il a été trouvé que la prednisone est bénéfique pour les muscles de *C. elegans* déficients en dystrophine (*figure 61*). En effet, la prednisone diminue de 40% le nombre de cellules dégénérées.

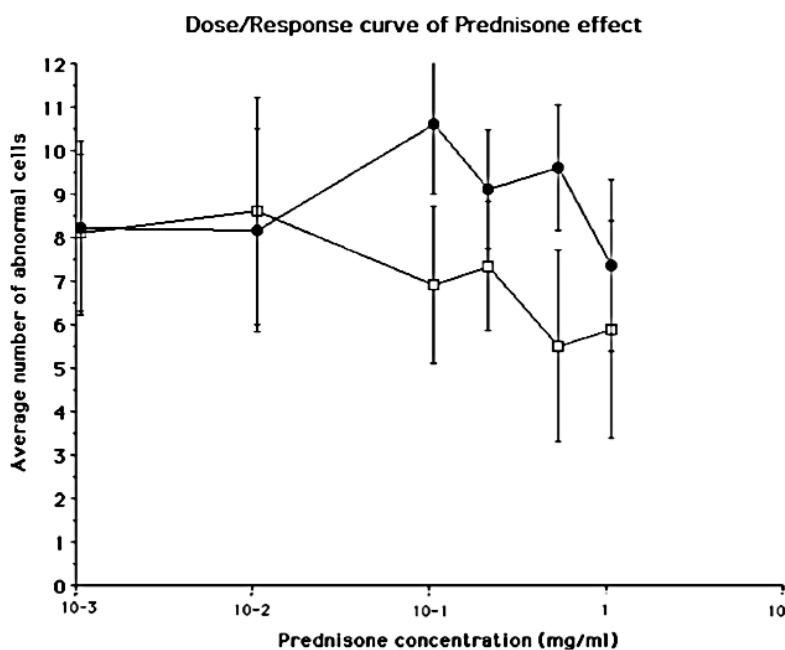


Figure 61 : Effet de la prednisone sur les muscles de *C. elegans*. Courbe montrant le nombre de cellules musculaires pariétales anormales (dégénérées), selon la concentration en prednisone. Les carrés représentent les traitements à la prednisone, tandis que les cercles représentent un volume équivalent en solvant (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine). L'axe des abscisses représente les concentrations en prednisone et les lignes verticales indiquent l'écart-type de chaque point. Le traitement à la prednisone à des concentrations de 10⁻¹ mg/ml ou plus diminue de manière significative le nombre de cellules anormales, $p < 0,05$ [81].

L'effet le plus fort est observé avec la prednisone à une concentration de 0.5 mg/ml (1.4 mM), où elle permet une réduction de moitié du nombre de cellules anormales, ($n=5,4$ contre 9,4 chez les contrôles). L'écart-type important est dû aux variations importantes d'un animal à un autre, une caractéristique de cette souche qui avait déjà été rapportée. Cependant, malgré cette variation inter-animal, les résultats étaient statistiquement significatifs avec $p < 0,05$ pour toutes les concentrations testées de 0,1 à 1mg/mL (0,28-2,8 mM) [81].

Les études ont aussi porté sur le moment et la durée les plus propices au traitement à la prednisone pour avoir un effet sur *C. elegans* Dmd. Les premiers essais (prednisone vs solvant) ont montré que l'incubation à l'âge de 0 à 2 jours est suffisant pour avoir un effet bénéfique de la prednisone. L'incubation de la prednisone à l'âge de 5 à 7 jours est suffisante pour réduire le nombre de cellules dégénérées. Pour les animaux traités à partir du jour 6, moment où le pic de dégénérescence a lieu, un petit effet est également visible, bien qu'il ne soit pas significatif comparé aux individus qui n'ont pas reçu de traitement (incubation dans un solvant pendant toute la durée). Le traitement à la prednisone est donc surtout efficace aux premiers stades de la maladie. Une des limites de cette méthode de recherche de molécule, à l'aide de l'incubation de *C. elegans*, est qu'on ne connaît pas les concentrations des molécules au sein des animaux. Cependant, on considère que pour ces premières étapes de sélection, la problématique quantitative n'est pas très importante, ces études ne devant pas être considérées comme des études précliniques, mais seulement comme des études permettant d'identifier de potentiels traitements qui devront être davantage étudiés chez les modèles mammifères par la suite.

En effet, comme les stéroïdes ont de nombreuses cibles chez l'homme, il est souvent difficile de trier leurs différents effets. En particulier, il reste à savoir si l'effet positif des stéroïdes observés chez les patients DMD provient d'une meilleure survie des fibres musculaires squelettiques ou s'il s'agit d'un effet indirect, suite à une réduction de la réponse inflammatoire. Peu d'études ont été réalisées sur l'effet direct des stéroïdes sur les cultures de cellules musculaires. Il a été montré qu'ils

réduisent l'influx du calcium dans les myotubes, ce qui est considéré comme bénéfique lors de myopathie de Duchenne et de Becker. Cependant, au vu de leurs nombreuses cibles dans l'organisme, il est difficile de certifier que ce mécanisme est celui qui cause leur effet thérapeutique. *C. elegans* étant peu enclin à faire de l'inflammation de manière générale, cela suggère que la prednisone, en plus d'agir sur l'inflammation, a un effet direct sur la survie musculaire [81].

Des co-traitements aux stéroïdes ayant un effet synergique sont recherchés dans le cas des myopathies de Duchenne et de Becker, en espérant que la combinaison de différents traitements puisse permettre de réduire les doses de corticostéroïdes et donc diminuer les effets secondaires qui y sont associés.

C. Des co-traitements aux stéroïdes, des exemples non-exhaustifs

1. Utilisation d'arginine butyrate

L'arginine butyrate, un sel formé par l'association de butyrate et d'arginine, combine deux effets pharmacologiques, l'activation des voies de signalisation de l'oxyde nitrique et l'inhibition de l'histone deacetylase.

Son administration associée à la prednisolone, a permis un changement dans l'expression des gènes importants dans la progression de la maladie, en contrôlant l'inflammation, la fibrose, la croissance musculaire et la régénération. Chez la souris mdx, cette association s'est avérée être plus efficace que le traitement à la prednisone seule, permettant une meilleure protection contre la maladie [12].

L'administration de l'arginine butyrate seule par perfusion intrapéritonéale continue, à des souris mdx, a presque doublé la quantité d'utrophine dans les muscles squelettiques, le cœur et le cerveau, associé à une amélioration du phénotype dystrophique chez les souris adultes et nouveau-nées. On note une diminution respective de 45% et 70% des taux de CK, une diminution de 30% des zones de nécrose dans les membres et une augmentation de 14% du volume courant. Son utilisation s'avère donc intéressante pour une utilisation chez de très jeunes enfants, voire des nouveau-nés. Des administrations intermittentes, utilisées dans des essais cliniques, ont ensuite été utilisées afin de diminuer la fréquence des injections et augmenter la sécurité. Elles ont aussi permis de presque doubler les concentrations en utrophine et d'atténuer le phénotype dystrophique. En effet, les tests d'agrippement des souris ont révélé des résultats similaires à ceux obtenus avec des contrôles sains et les taux en CK étaient divisés par deux [137].

Une expression de l'utrophine doublée a aussi été mise en évidence lors du traitement par l'arginine butyrate de cultures de myotubes humains [137].

2. Utilisation de la taurine

La taurine est un acide aminé capable de moduler l'excitabilité du sarcolemme et la gestion du calcium. Lorsqu'elle est administrée en association à la prednisone chez des souris mdx, la force des membres thoraciques est augmentée, bien que les niveaux de CK et l'atteinte musculaire squelettique ne soient pas améliorés [12].

L'augmentation de la concentration en taurine dans les muscles des souris mdx permet d'augmenter la force et la fonction musculaire *in vivo* et *ex vivo*, probablement par des effets anti-inflammatoires et antioxydants [138].

L'augmentation des concentrations en taurine dans l'organisme se font de préférence par l'augmentation de son ingestion [138].

3. L'aminophylline (théophylline)

L'aminophylline est une combinaison de théophylline anhydre et d'éthylène diamine. C'est un inhibiteur non sélectif de phosphodiesterase (PDE). Les propriétés pharmacologiques de l'aminophylline sont celles de la théophylline. Après injection intraveineuse, la théophylline est immédiatement libérée dans l'organisme par hydrolyse.

La structure musculaire chez des poissons-zèbre déficients en dystrophine apparaît normale 30 jours post-fécondation (dpf), suite à un traitement à l'aminophylline. Elle permet donc une amélioration du phénotype dystrophique et semble ralentir l'évolution de la myopathie [134].

Par ailleurs, il a aussi été montré chez la souris mdx, que des inhibiteurs de la PDE permettent d'améliorer le phénotype dystrophique. En effet, les inhibiteurs des PDE augmentent la concentration intracellulaire d'AMPc et/ou de GMPc, ce qui active les protéines kinases A, responsables de la surexpression de certaines protéines qui pourraient moduler la progression de la maladie au sein des muscles squelettiques. En effet, la phosphorylation des enzymes-clés par les protéines kinases A activées par l'AMPc, permet d'activer ou d'inhiber les réactions catalytiques et donc de réguler les voies métaboliques. De plus, la phosphorylation des molécules trans-régulatrices permet de réguler la transcription de certains gènes [134].

4. Des antioxydants non spécifiques

D'autres composés ont montré un effet bénéfique chez la souris mdx, tels que les antioxydants que contient le thé vert. En effet, le stress oxydatif semble contribuer à l'atteinte musculaire via les produits toxiques du métabolisme de l'oxygène qui sont piégés dans les myofibres et qui entraînent leur dégénérescence [12].

L'épigallocatechine-3 gallate, un polyphénol antioxydant présent dans le thé vert, a permis de normaliser les niveaux de créatine kinase (CK) chez des souris mdx, et de diminuer de moitié les lésions dans les tissus musculaires. Par ailleurs, les polyphénols de feuilles de thé vert (*Amellia sinensis*) non fermentées, diminuent le niveau de la CK et normalisent la morphologie des myofibres chez la souris mdx.

Les flavonoïdes extraits du thé vert (flavocoxid dans cette étude) ont des propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes. Ils réduisent l'expression des marqueurs du stress oxydatif, les niveaux de CK et la nécrose des myofibres. Cette molécule a aussi permis d'améliorer la fonction des muscles squelettiques [12].

Il a également été noté qu'une administration orale d'oxyde nitrique (dérivé de flurbiprofen) pendant un an ralentissait davantage la progression de la dystrophie musculaire que le traitement à la prednisolone seul. Le niveau de CK a été diminué, et la motilité et l'histologie des muscles a été améliorée chez les souris mdx [12]. En effet, lors des myopathies de Duchenne et de Becker, la dysfonction de la NO synthase perturbe la fonction des mitochondries. La L-arginine et la metformine sont deux composés qui stimulent la production d'oxyde nitrique (NO), habituellement synthétisé par la NO synthase. Sa production permet d'améliorer la fonction des mitochondries et d'améliorer la fonction musculaire [133]. Suite aux résultats encourageants des essais avec la L-arginine et la metformine et compte tenu du petit nombre de participants, de la courte durée du traitement et de l'absence de groupe contrôle (sous placebo), deux autres essais de phase III sont en cours pour la DMD et la BMD. Ils évaluent les effets de la L-citrulline, un précurseur de l'arginine, et la metformine. Ces deux molécules pourraient améliorer la fonction motrice et retarder l'évolution des dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker.

Malgré ces résultats prometteurs, l'utilisation d'antioxydants non spécifiques lors des études chez l'homme a mené à des résultats inconstants, et un meilleur ciblage de ces antioxydants pourrait être plus efficace dans le traitement des patients DMD [12].

III. Les antifibrotiques

A. La fibrose lors de myopathie de Duchenne et de Becker

Le mécanisme précis de la fibrose chez la souris mdx reste largement incompris mais semble être lié à des cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de croissance transformant (TGF) β 1, l'interleukine (IL)-6, le facteur de nécrose tumorale (TNF) et l'interleukine (IL)-1b, dont le niveau est élevé chez les souris mdx [12].

Chez le poisson-zèbre *Dmd* on peut mettre en évidence une fibrose qui s'installe entre les fibres des muscles squelettiques au cours de l'évolution de la myopathie (*figure 62*) [41]. La mise en place de fibrose comme chez l'homme peut être considérée comme un événement clé dans le processus dystrophique, puisqu'il semble mener à une perte irréversible de l'organisation tissulaire du muscle, ainsi qu'à un remplacement permanent des fibres musculaires par du tissu graisseux et fibreux, tel que du collagène et la prolifération de fibroblastes. Agir contre cette fibrose serait donc un point essentiel dans le traitement contre les myopathies de Duchenne et de Becker.

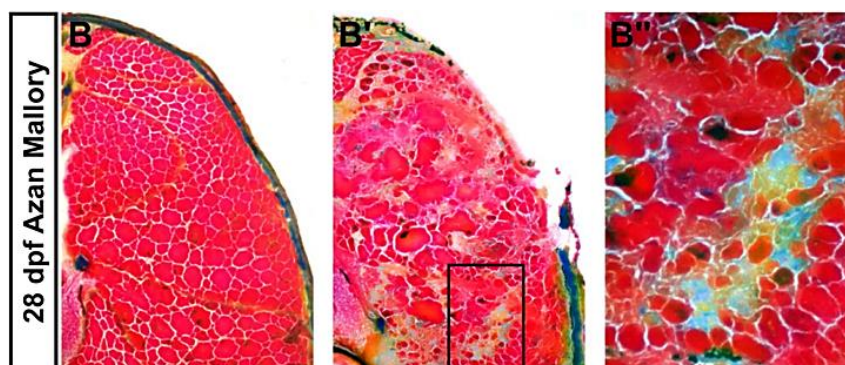


Figure 62 : Coupes de muscles de poissons-zèbre homozygotes *Dmd*^{ta222a/ta222a} à 28 jours post-fécondation (dpf), colorées au colorant Azan-Mallory. Mise en évidence de tissu fibreux coloré en bleu (B'), tandis que le muscle d'individus sains ne prend pas le colorant (B). Zoom de B' (B''), [41].

B. L'Halofuginone

L'Halofuginone est utilisé dans des dystrophies musculaires variées pour la prévention de la fibrose et de l'inflammation. En effet, l'Halofuginone bloque TGF β , qui stimule la synthèse de collagène chez les souris mdx de 4 semaines [12].

Par ailleurs, des études sur des cultures cellulaires de myofibres ont montré que l'Halofuginone stimule directement le cycle cellulaire des cellules satellites attachées aux myofibres chez la souris mdx [139]. Il favorise la fusion des myotubes des myoblastes primaires et inhibe l'apoptose des cellules satellites. Bien qu'il s'agisse de cultures cellulaires de myofibres de souris mdx, leur préparation permet une représentation fiable de ce qui se passe *in vivo*. De plus, il a aussi été montré une meilleure survie des cellules satellites *in vivo* dans les muscles de souris mdx. En effet, les cellules satellites sont la principale voire la seule source pour les myoblastes dans les muscles en régénération. Leur capacité à entrer dans le cycle cellulaire et à se différencier en myoblastes est donc d'importance majeure lors d'atteinte musculaire.

L'Halofuginone favorise aussi la survie des cellules musculaires chez la souris mdx en réduisant l'apoptose des myoblastes et des myofibres.

Aucun effet n'est noté chez les contrôles sains, suggérant que l'Halofuginone a une action ciblée sur les cellules satellites des muscles dystrophiques présentant une inflammation chronique et de la fibrose.

L'Halofuginone possède donc un double rôle dans les muscles dystrophiques. Il constitue un agent anti-fibrotiques et influence directement le cycle cellulaire et favorise la survie des cellules. En effet, l'Halofuginone inhibe la prolifération cellulaire et augmente l'apoptose des myofibroblastes à l'origine de la fibrose, tandis qu'il stimule l'activité du cycle cellulaire des cellules satellites ainsi que la survie des cellules musculaires. C'est la balance entre ces activités qui permet l'effet bénéfique de l'Halofuginone sur la fibrose, la régénération musculaire et la fonction musculaire.

C. La Sphingosine-1-phosphate (S1P), un lipide bioactif

La Sphingosine-1-phosphate est connue pour promouvoir les processus anaboliques dans les muscles en augmentant la prolifération des cellules souches et en favorisant la différenciation musculaire.

Chez le modèle drosophile *Dmd* il a été mis en évidence que les agents pharmacologiques qui augmentent le niveau de la S1P induisent une amélioration des lésions musculaires *in vivo* [135].

L'augmentation des concentrations en S1P chez des mutants *Dmd* de la drosophile avec un métabolisme des sphingolipides altéré permet de supprimer l'altération des muscles. Cette augmentation des concentrations en S1P est possible en limitant la sortie de S1P des cellules. Cela peut se faire en bloquant ses transporteurs pour augmenter sa concentration cytoplasmique. De plus, l'apport de S1P dans des muscles dystrophiques augmente la prolifération des précurseurs des cellules musculaires. La libération systémique d'un inhibiteur de la S1P-lyase, le 2-acetyl-4(5)-tetrahydroxybutyl imidazole (THI), réduit de manière marquée la fibrose et le dépôt de graisse chez des souris dystrophiques et améliore la fonction musculaire suite à des lésions aiguës. De plus, le traitement pendant un mois avec du THI apportait des effets bénéfiques aux muscles dystrophiques de la souris *mdx*. Le THI est retrouvé parmi les composants du colorant alimentaire Caramel Color III, catégorisé comme sûr, par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA ; food and drug administration), ce qui en fait un candidat intéressant pour une potentielle utilisation chez l'homme, car l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en serait fortement facilitée.

THI-oxime (ou LX2931) est un dérivé du THI et est à l'étude dans des essais cliniques pour traiter l'arthrite rhumatoïde. FTY720 est un agoniste de S1P et constitue un médicament autorisé par la FDA pour traiter la sclérose en plaques. Ces deux molécules permettent d'augmenter soit la quantité de S1P, soit sa signalisation. Lorsqu'elles sont mélangées à la nourriture des drosophiles *Dmd*, elles entraînent une suppression de la dégénérescence des fibres musculaires. Des résultats similaires ont été obtenus chez la souris *mdx*. De plus, ces molécules étant des médicaments humains, elles constituent des traitements de choix pour agir sur l'atteinte musculaire des patients DMD, ayant déjà l'AMM et ayant donc été soumis à des tests d'innocuité. Il s'agit dans un premier temps de réaliser des études plus précises sur l'effet de THI-oxime et de FTY720 sur les lésions musculaires chez la souris *mdx*, afin de pouvoir passer aux essais cliniques chez les patients DMD.

IV. Inhibition de la myostatine pour augmenter la force musculaire

La myostatine est un facteur de régulation de la croissance musculaire de la famille des TGF- β et inhibe la croissance musculaire endogène.

Des mutations dans le gène de la myostatine entraînent une hypermuscularité chez la souris, la vache, le chien et chez l'homme [1]. L'inhibition du gène de la myostatine protège les souris *mdx* en entraînant une diminution de la fibrose musculaire et une augmentation de la force de contraction des muscles [2].

Afin de déterminer si l'inhibition de la myostatine améliore aussi l'atteinte musculaire chez les chiens cDMD, un propeptide bloquant la myostatine a été exprimé dans le foie de quatre chiens cDMD de 9-10 mois à l'aide d'un vecteur AAV. Treize mois après l'injection, la masse musculaire avait augmenté. De plus, ce traitement a permis de diminuer les niveaux de créatine kinase CK, ainsi que la fibrose musculaire [2]. Ce propeptide de la myostatine a aussi été exprimé localement dans les membres de deux chiens de 3 mois à l'aide de vecteurs AAV. L'expression du gène du propeptide a été suivie par PCR quantitative, western blot et immunofluorescence. La surexpression du propeptide de la myostatine a entraîné une augmentation de la croissance musculaire, mise en évidence par des myofibres plus larges dans de multiples muscles, et un volume musculaire augmenté à l'IRM.

La follistatine est un peptide d'origine naturelle et un puissant inhibiteur de la myostatine. Son utilisation possible dans le cadre des myopathies de Duchenne et de Becker est à confirmer.

V. L'utilisation de cellules souches pour régénérer les fibres des muscles dystrophiques

La transplantation de précurseurs des cellules musculaires (myoblastes), de donneurs normaux, a été étudiée pour restaurer la protéine dystrophine dans les muscles dystrophiques. En effet, les précurseurs musculaires transplantés peuvent se différencier et ainsi exprimer la dystrophine dans le muscle, puis persister comme une partie du myotome de manière indéfinie. Cette technique permet d'éviter les problèmes liés à la manipulation du très large gène de la dystrophine. Cependant, elle nécessite de devoir traiter de grands volumes de muscles. La thérapie cellulaire présente un grand intérêt lors des cas plus chroniques, pour lesquels la thérapie génique par exemple est presque trop tardive [1].

Une variété de cellules souches adultes, fœtales et embryonnaires peuvent potentiellement contribuer à la régénération de muscles lésés (*tableau 12*). Les premières cellules choisies lors des premières études de thérapie cellulaire dans les années 90 étaient des myoblastes et leurs cellules satellites [140].

Tableau 12 : Etudes précliniques de thérapies cellulaires chez le chien cDMD, [2].

Cell therapy	
Cardiomyocytes	Koh et al. (1995)
Hematopoietic stem cells	Dell'Agnola et al. (2004)
Mesoangioblasts	Sampaolesi et al. (2006)
Dental pulp cells	Kerkis et al. (2008)
Myoblasts	Parker et al. (2008)
Muscle stem cells	Rouger et al. (2011)
Human adipose-derived mesenchymal stromal cells	Vieira et al. (2011)
Umbilical cord mesenchymal stromal cells	Zucconi et al. (2011)

L'injection de myoblastes à des souris mdx entraîne leur fusion avec les cellules de l'hôte et restaure l'expression de la dystrophine [1].

Chez les patients DMD cependant, l'utilisation de myoblastes n'a pas montré d'amélioration fonctionnelle, malgré le fait que des cellules du donneur soient détectées dans leurs muscles [2]. La faible efficacité de la transplantation de myoblastes pourrait être attribuée à une forte mortalité des cellules dès le début, probablement liée à une faible perfusion sanguine des cellules injectées, à un rejet par le système immunitaire et à une faible migration des cellules injectées qui survivent.

Les myoblastes canins et leur transplantation chez le modèle cDMD ont également été étudiés dans les années 1990 [2]. Les myoblastes ont été marqués avec des microsphères fluorescentes, puis injectés à des chiens normaux de 3 mois, associés à une toxine musculaire, la notexine, et au bleu de méthylène. A 7 et 24 jours post-transplantation, des groupes de cellules injectées se sont formés et exprimaient l'ATPase (*figure 63*). Ceci montre de manière générale que les myoblastes peuvent s'implanter et se différencier dans les muscles des chiens. Cependant, il n'a pas été possible d'implanter les myoblastes de manière significative.

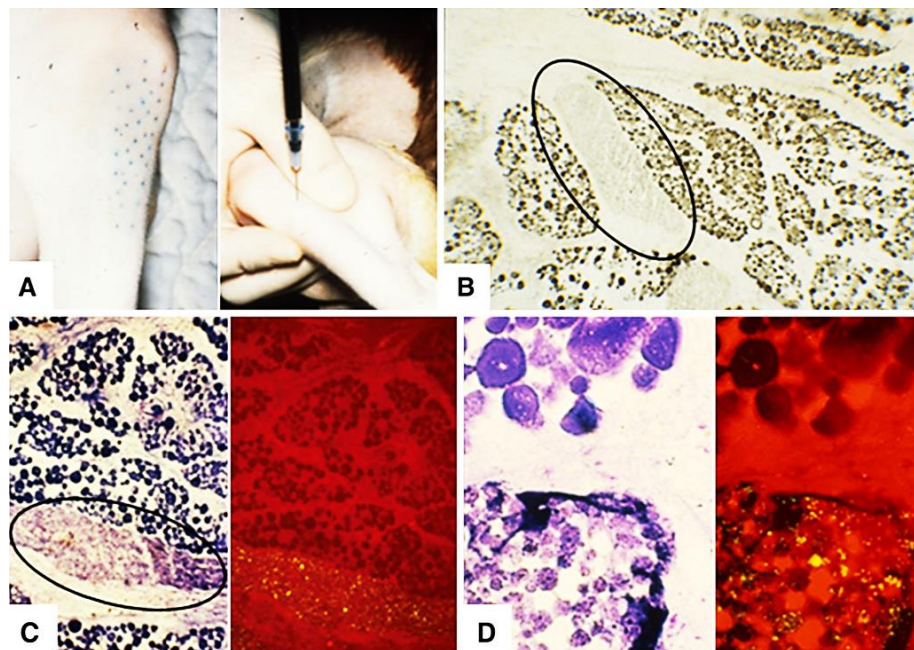


Figure 63 : Modèle de transplantation autologue de myoblastes chez des chiens normaux. Les cellules sont injectées en transcutané (A, droite) ; le bleu de méthylène permet de repérer les sites d'injection (A, gauche). De grands agrégats de cellules contenant des microsphères fluorescentes forment des amas (cercles en B et C). Les fibres musculaires dans ces amas prennent la coloration ATPase (pH 9,4), le bleu de toluidine (images de gauche en C et D) et contiennent des microsphères fluorescentes (images de droite en C et D), à 24 heures post-transplantation, [2].

De nombreux travaux ont été effectués sur la transplantation de myoblastes dans différentes espèces avec des résultats prometteurs. Il a même été possible d'implanter de manière stable des cardiomyocytes dans des cœurs de chiens cDMD [2]. Cependant les résultats ont été décevants lors des essais cliniques [22]. Le niveau d'implantation des myoblastes pourrait être augmenté chez les chiens cDMD en induisant une première tolérance à travers la transplantation de cellules hématopoïétiques [2]. Une injection intra-artérielle de cellules souches musculaires allogéniques a permis une expression de la dystrophine sur le long terme, ainsi qu'une stabilisation visible des lésions pathologiques et de la fonction clinique chez trois chiens cDMD. Contrairement à une injection intraveineuse lors de laquelle les cellules sont filtrées par de nombreux organes de l'animal, une injection intra-artérielle permet aux cellules d'arriver directement aux muscles et entraîne donc une implantation beaucoup plus importante de ces cellules au niveau des muscles. De plus, l'injection des cellules souches directement dans le diaphragme, au lieu d'une injection systémique, peut réduire la migration cellulaire vers d'autres zones touchées et ainsi accroître les chances de

réorganisation musculaire au niveau du diaphragme. En effet, 80% des décès sont liés à une défaillance diaphragmatique chez les patients DMD. Cependant, l'injection des cellules souches localement dans le diaphragme n'a permis qu'une régénération modérée de l'organisation musculaire chez des souris mdx [141].

Le poisson-zèbre constitue un bon modèle pour l'étude de la transplantation de cellules souches, puisque son développement, notamment musculaire, est très rapide et qu'il est possible d'observer les différents stades de développement [3]. Les muscles adultes du poisson-zèbre contiennent des cellules mononucléées, qui peuvent être cultivées *in vitro*, afin de suivre leur évolution et la formation de myotubes. Ces cellules peuvent être transplantées à des embryons en développement et contribuent ainsi au développement musculaire.

Par ailleurs, la moelle osseuse offre une population de cellules souches accessibles et pluripotentes, donc capables de se différencier en plusieurs types cellulaires. Malgré des résultats prometteurs chez la souris mdx, la transplantation de cellules souches de la moelle osseuse (bone marrow stem cell (BMSC)) n'a pas permis de restaurer l'expression de la dystrophine chez des chiens cDMD [2].

D'autres populations de cellules souches adultes pourraient contribuer à la régénération musculaire. Les mésangioblastes, cellules souches du mésoderme dérivées des parois vasculaires, contribuent à la régénération musculaire chez la souris mdx et le chien cDMD [2]. Ces cellules sont multipotentes, avec la possibilité de donner des lignées cellulaires osseuses, adipeuses, myogéniques et endothéliales. En effet, il a été montré qu'une masse cellulaire importante pouvait être obtenue chez des chiens cDMD et que l'injection de mésangioblastes dans l'artère fémorale permet d'avoir accès aux muscles à travers les lits de capillaires. Une expression de la dystrophine, chez des chiens cDMD traités avec des mésangioblastes, a pu être mise en évidence par immunohistochimie et Western blot. Cependant, des questions ont été soulevées concernant les critères d'évaluation utilisés et le rôle qu'avait pu jouer l'immunosuppression dans l'amélioration de la technique.

Des cellules souches de pulpe dentaire immature d'homme ont également été transplantées par des injections artérielles ou intramusculaires chez quatre jeunes chiens cDMD [2]. On a pu observer une implantation cellulaire et une expression minimale de la dystrophine.

Par ailleurs, l'implantation musculaire a été possible après une administration systémique de cellules mésenchymateuses du stroma du cordon ombilical (MSCs) et de cellules stromales humaines dérivées des cellules adipeuses, (hASCs) chez des chiens cDMD [2]. Aucune immunosuppression n'a été utilisée dans ces études. L'expression de la dystrophine a été mise en évidence avec les cellules hASCs, alors que ça n'a pas été le cas avec les cellules MSCs.

Le type de cellule souche à utiliser reste un sujet de discussion dans le cadre de la myopathie de Duchenne et de Becker, notamment à cause de l'atteinte multi-organique qu'elle engendre.

VI. Phases cliniques chez l'homme des thérapies pharmacologiques et cellulaires

Tableau 13 : Essais cliniques des thérapies pharmacologiques et cellulaires chez les patients DMD [133].

Méthode		Maladie	Phase d'essai	Résultats
Réduire l'inflammation	Glucocorticoïdes	DMD ayant perdu la marche		effet bénéfique sur la fonction des membres supérieurs
	Prednisone vs Déflazacort	DMD	III	en cours
	Déflazacort	DMD	I	en cours
	Prednisone	DMD nourrissons	II	en cours
	AINS (VBP15)	Volontaires sains	I	en cours
	AINS (CAT-1004)	DMD	I/ II	en cours
Favoriser la production d'utrophine	Ezutromid (ou SMT C1100)	DMD	I (II envisagé courant 2016)	Bonne tolérance et absorption rapide
Stimulation production d'oxyde nitrique (NO)	L-citrulline et metformine	DMD/ BMD	III	en cours
Diminuer le stress oxydatif	Idébénone (atteinte respiratoire)	DMD	III	améliorations significatives
Favoriser irrigation sanguine du muscle	Inhibiteur de la PDE5 (Tadalafil)	DMD	III	en cours (résultats peu significatifs pour l'instant)
Améliorer la force musculaire	Inhibiteurs de la synthèse de la prostaglandine hématopoïétique (TAS-205)	DMD	I (II en préparation)	en cours
Ciblage des récepteurs de la ryanodine (RyR)	Action sur des canaux calciques intracellulaires (ARM210)	DMD	I	en cours
Réduire la fibrose	HT-100 (ou dérivé de l'Halofuginone)	DMD		suspendu suite à décès
Anti-myostatine	Anticorps anti-myostatine (PF-06252616)	Volontaires sains/ DMD	I/ II	en cours
	Inhibiteur de la myostatine (BMS-986089)	DMD	I/ II	en cours
Thérapie cellulaire	Transplantation de mésangioblastes	DMD	I/ II	Bonne tolérance, faisabilité OK, études plus larges à envisager
	Cellules souches de moelle osseuse	DMD	I/ II	en cours
	Cellules souches de sang de cordon	DMD	I/ II	en cours
	Myoblastes	DMD	I/ II	en cours
Atteinte cardiaque	Béta-bloquants (Nébivolol)	DMD	III	en cours
	IECA			
	Diurétiques anti-aldostérones (Eplérénone et Spironolactone)	DMD	III	en cours
	Inhibiteur sélectif du transporteur sodium/proton NHE-1 (Riméporide)	DMD	I	en cours

Conclusion

Les modèles animaux nous ont permis de grandement améliorer la compréhension de la fonction biologique de la dystrophine et de la physiopathologie des myopathies de Duchenne et de Becker.

De plus, ils ont constitué d'excellents modèles pour le développement de la thérapie génique et pour l'étude de son efficacité et de sa toxicité. D'énormes progrès ont été effectués et beaucoup d'obstacles ont été surmontés dans le développement des modèles animaux, au cours de trois dernières décennies, pour développer des modèles qui caractérisent au mieux les myopathies de Duchenne et de Becker. Le modèle souris mdx par exemple possède à présent de nombreux variants qui permettent de mieux mimer l'atteinte chez l'homme. Une large collection de modèles animaux pour les myopathies de Duchenne et de Becker est donc disponible et continue de s'élargir. Bien que cela offre des opportunités pour réaliser des comparaisons entre les différentes espèces et le passage des thérapies à des mammifères de plus en plus grands, cela rajoute également une certaine complexité et une certaine difficulté dans la sélection des modèles pour les études précliniques. Les avantages et les limites de chaque modèle peuvent varier selon l'étude voulue. Certains aspects de la myopathie de Duchenne cependant, comme l'atteinte neurocognitive, se révèlent être difficilement modélisables. De plus, les animaux n'étant pas des êtres humains, les études permettent au fur et à mesure d'avoir une idée sur les résultats des études cliniques, mais pas d'en prédire le résultat réel chez l'homme. Cependant, les connaissances apportées par les études menées sur les modèles animaux s'avèrent indispensables [1], [52], que ce soit dans la recherche d'une thérapie génique, cellulaire ou pharmacologique.

Les modèles non-mammifères *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* et le poisson-zèbre *Danio rerio*, ainsi que les modèles félines, hypertrophiques ou non-hypertrophiques sont actuellement rarement utilisés dans les études sur les thérapies contre la myopathie de Duchenne, tandis que les nouveaux modèles récemment développés, le rat et le porc, vont être intégrés dans des études de développement de nouvelles thérapies pour les myopathies de Duchenne et de Becker.

Actuellement, les stratégies de thérapie génique notamment celles utilisant différents vecteurs viraux ou non, ne sont pas prêtes pour un développement clinique à cause de problèmes liés à des difficultés de délivrance du transgène, de réponse immunitaire de l'hôte, de purification des vecteurs et ainsi de suite. Le développement d'une thérapie génique efficace pour la myopathie de Duchenne repose et continuera à reposer fortement sur l'utilisation de modèles animaux. Les études animales ne permettent pas seulement d'établir le principe de base d'un traitement, mais ils sont également indispensables pour l'optimisation des protocoles avant et pendant les tests humains. Certaines études ne peuvent être effectuées sur des individus humains atteints, telles que des études nécropsiques ou des études de mesures de force musculaire sur un muscle spécifique *in situ* et *ex vivo* et nécessitent d'être effectuées sur des modèles animaux [1], [100].

En effet, guérir une souris déficiente en dystrophine ne s'avère plus hors de portée avec les technologies actuelles, ce qui est fortement encourageant dans la recherche de traitements pour l'homme.

Cependant, alors que plusieurs thérapies développées au cours de la dernière décennie ont intégré les essais cliniques chez l'homme, de nouvelles problématiques surgissent, telles que la réponse immunitaire aux vecteurs AAV ou le transfert des gènes par voie systémique. Il est préférable de répondre à la plupart de ces questions via des modèles animaux plus grands, tel que le modèle canin cDMD, qui représente bien la maladie chez l'homme, mais dont certaines caractéristiques doivent être précisées.

De telles études soulèvent des questions d'éthique, d'une part du fait que les tests soient effectués sur des animaux vivants et d'autre part du fait que les myopathies de Duchenne et de Becker touchent de très jeunes enfants et qu'il n'est pas toujours facile de réaliser les études cliniques dans le contexte de maladies handicapantes évolutives qui font souffrir le patient et sa famille. En effet, ces derniers portent beaucoup d'espoir sur un éventuel traitement curatif et vivent mal l'échec, d'éventuels effets secondaires ou de faire partie de groupes placebo ; d'autant plus que ce sont des malades à risque plus élevé d'anxiété et de dépression de par leur pathologie [142].

Certaines thérapies avec un risque potentiel, tels que les thérapies géniques ou cellulaires, doivent être dans l'idéal testés sur des modèles animaux adaptés, tels que le modèle souris mdx ou les modèles canins déficients en dystrophine. Cela soulève des questions d'éthique puisque les animaux dystrophiques générés ont parfois des phénotypes sévères et il est difficile de leur assurer une vie décente. Par ailleurs, les suivis d'efficacité des traitements sur ces animaux reposent notamment sur des biopsies répétées, des euthanasies [2] ... Cependant, ces études se font dans un cadre très réglementé avec notamment une gestion de la douleur adaptée et l'euthanasie d'animaux trop malades.

Par ailleurs, la rapidité de développement de certaines techniques récemment tel que CRISPR/Cas9 soulève certaines questions d'éthique également [143], notamment du fait de sa simplicité d'utilisation qui pourrait appeler à un encadrement de sa mise en œuvre en laboratoire. En effet, cette méthode présente des avantages techniques à l'origine de sa très rapide diffusion. Il est apparu d'emblée important de distinguer trois domaines aux enjeux différents d'après l'INSERM (institut national de la santé et de la recherche médicale) :

« 1/ L'application de la technologie à l'homme qui soulève essentiellement la question des modifications de la lignée germinale.

2/ L'application à l'animal, en particulier aux espèces « nuisibles », qui soulève la question d'un éventuel transfert latéral de gènes et l'émergence de dommages irréversibles à la biodiversité.

3/ Des risques d'atteinte à l'environnement. »

Le but est d'encourager la recherche sur de telles technologies, tout en prenant certaines précautions et d'évaluer la balance bénéfice/risque.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, Christelle CAMUS, Enseignant-chercheur, de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **SCHOLL Valérie** intitulée « **Avancées dans la compréhension des myopathies de Duchenne et de Becker et de leur traitement à l'aide des modèles animaux.** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 20 octobre 2016
Docteur Christelle CAMUS
Enseignant chercheur
de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
La Directrice de l'École Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CIMITTELIN



Vu :
Le Président du jury :
Professeure Bettina COUDERC



Melle SCHOLL Valérie
a été admis(e) sur concours en : 2011
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2015
a validé son année d'approfondissement le : 08/09/2016
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier

Monsieur Jean-Pierre VINEL
La Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
Le Vice-Président de la CFVU



Bibliographie

- [1] J. W. McGreevy, C. H. Hakim, M. A. McIntosh, et D. Duan, « Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy », *Dis. Model. Mech.*, vol. 8, n° 3, p. 195-213, mars 2015.
- [2] J. N. Kornegay *et al.*, « Canine models of Duchenne muscular dystrophy and their use in therapeutic strategies », *Mamm. Genome*, vol. 23, n° 1-2, p. 85-108, févr. 2012.
- [3] L. M. Kunkel, E. Bachrach, R. R. Bennett, J. Guyon, et L. Steffen, « Diagnosis and cell-based therapy for Duchenne muscular dystrophy in humans, mice, and zebrafish », *J. Hum. Genet.*, vol. 51, n° 5, p. 397-406, mai 2006.
- [4] M. Koenig, A.P. Monaco, L.M. Kunkel, « The Complete Sequence of Dystrophin Predicts a rod-shaped cytoskeletal protein.pdf ». Elsevier, 22-avr-1988.
- [5] J. M. Ervasti, « Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.*, vol. 1772, n° 2, p. 108-117, févr. 2007.
- [6] D. Jung, B. Yang, J. Meyer, J. S. Chamberlain, et K. P. Campbell, « Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on β -dystroglycan », *J. Biol. Chem.*, vol. 270, n° 45, p. 27305–27310, 1995.
- [7] A. Suzuki, M. Yoshida, et E. Ozawa, « Mammalian alpha 1-and beta 1-syntrophin bind to the alternative splice-prone region of the dystrophin COOH terminus. », *J. Cell Biol.*, vol. 128, n° 3, p. 373–381, 1995.
- [8] K. A. Lavidas, « The Dystrophin Glycoprotein Complex: Signaling Strength and Integrity for the Sarcolemma », *Circ. Res.*, vol. 94, n° 8, p. 1023-1031, avr. 2004.
- [9] Myinfo, département d'information sur les maladies neuromusculaires de l'AFM-Téléthon, Evry, « Avancées dans les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker ». Savoir & Comprendre, Juin-2013.
- [10] B. J. Petrof, J. B. Shrager, H. H. Stedman, A. M. Kelly, et H. L. Sweeney, « Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction », *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 90, p. 3710-3714, 1993.
- [11] K. E. Davies et K. J. Nowak, « Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players », *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 7, n° 10, p. 762-773, oct. 2006.
- [12] J. Manning et D. O'Malley, « What has the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy contributed to our understanding of this disease? », *J. Muscle Res. Cell Motil.*, févr. 2015.
- [13] A. P. Monaco, R. L. Neve, C. Colletti-Feener, C. J. Bertelson, D. M. Kurnit, et L. M. Kunkel, « Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene », *Nature*, vol. 323, n° 6089, p. 646-650, oct. 1986.
- [14] M. Koenig, E.P. Hoffman, C.J. Bertelson, A.P. Monaco, C. Feener, L.M. Kunkel, « Complete cloning of the duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals Koenig 1986.pdf ». Elsevier, Cell, 31-juill-1987.
- [15] « La banque de données des mutations du gène DMD UMD-DMD France [en ligne], consulté le 05/05/2015 ». .
- [16] D. Duan, « Dystrophin Gene Replacement and Gene Repair Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy in 2016: An Interview », *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.*, vol. 27, n° 1, p. 9-18, mars 2016.
- [17] M. Koenig *et al.*, « The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion », *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 45, n° 4, p. 498, 1989.
- [18] T. W. Prior et S. J. Bridgeman, « Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy », *J. Mol. Diagn.*, vol. 7, n° 3, p. 317–326, 2005.
- [19] G. Bulfield, W. G. Siller, P. A. Wight, et K. J. Moore, « X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 81, n° 4, p. 1189–1192, 1984.

- [20] P. Sicinski, Y. Geng, A. Ryder-Cook, E. Barnard, M. Darlison, et P. Barnard, « The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation », *Science*, vol. 244, n° 4912, p. 1578, juin 1989.
- [21] K. M. Flanigan *et al.*, « Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort », *Hum. Mutat.*, vol. 30, n° 12, p. 1657-1666, déc. 2009.
- [22] C. A. Collins et J. E. Morgan, « Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies », *Int. J. Exp. Pathol.*, vol. 84, n° 4, p. 165–172, 2003.
- [23] H. Meier, « Myopathies in the dog », in *The Cornell veterinarian*, vol. 48, 1958.
- [24] N. J. H. Sharp *et al.*, « An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy », *Genomics*, vol. 13, n° 1, p. 115-121, mai 1992.
- [25] Yoshiki SHIMATSU, Kouichi KATAGIRI, Toshio FURUTA, Masao NAKURA, Yoshikuni TANIOKA, Katsutoshi YUASA, Masayuki TOMOHIRO, Joe N. KORNEGAY, Ikuya NONAKA, Shin'ichi TAKEDA, « Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMD).pdf ». *Experimental Animals*, 2003.
- [26] L. G. Miyazato, J. R. E. Moraes, D. C. Beretta, et J. N. Kornegay, « Muscular Dystrophy in Dogs: Does the Crossing of Breeds Influence Disease Phenotype? », *Vet. Pathol.*, vol. 48, n° 3, p. 655-662, mai 2011.
- [27] E. Zucconi *et al.*, « Ringo: Discordance between the molecular and clinical manifestation in a Golden Retriever Muscular Dystrophy dog », *Neuromuscul. Disord.*, vol. 20, n° 1, p. 64-70.
- [28] T. Larcher *et al.*, « Characterization of Dystrophin Deficient Rats: A New Model for Duchenne Muscular Dystrophy », *PLoS ONE*, vol. 9, n° 10, p. e110371, oct. 2014.
- [29] K. Nakamura *et al.*, « Generation of muscular dystrophy model rats with a CRISPR/Cas system », *Sci. Rep.*, vol. 4, juill. 2014.
- [30] J.H. Vos, J.S. van der Linde-Sipman, S.A. Goedegebuure, « Dystrophy-like myopathy in the cat », *J. Comp. Pathol.*, vol. 96, p. 335-341, mai 1986.
- [31] J. L. Carpenter *et al.*, « Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency », *Am. J. Pathol.*, vol. 135, n° 5, p. 909, 1989.
- [32] N. J. Winand, M. Edwards, D. Pradhan, C. A. Berian, et B. J. Cooper, « Deletion of the dystrophin muscle promoter in feline muscular dystrophy », *Neuromuscul. Disord.*, vol. 4, n° 5–6, p. 433-445, sept. 1994.
- [33] N. Klymiuk *et al.*, « Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 22, n° 21, p. 4368-4382, nov. 2013.
- [34] F. Muntoni, S. Torelli, et A. Ferlini, « Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes », *Lancet Neurol.*, vol. 2, n° 12, p. 731–740, 2003.
- [35] D. J. Nonneman, T. Brown-Brandl, S. A. Jones, R. T. Wiedmann, et G. A. Rohrer, « A defect in dystrophin causes a novel porcine stress syndrome », *BMC Genomics*, vol. 13, n° 1, p. 233, 2012.
- [36] K. Hollinger, C. X. Yang, R. E. Montz, D. Nonneman, J. W. Ross, et J. T. Selsby, « Dystrophin insufficiency causes selective muscle histopathology and loss of dystrophin-glycoprotein complex assembly in pig skeletal muscle », *FASEB J.*, vol. 28, n° 4, p. 1600-1609, avr. 2014.
- [37] P. Spitali *et al.*, « DMD transcript imbalance determines dystrophin levels », *FASEB J.*, vol. 27, n° 12, p. 4909-4916, déc. 2013.
- [38] G. Acsadi *et al.*, « Novel Mutation in Spectrin-like Repeat 1 of Dystrophin Central Domain Causes Protein Misfolding and Mild Becker Muscular Dystrophy », *J. Biol. Chem.*, vol. 287, n° 22, p. 18153-18162, mai 2012.
- [39] D. I. Bassett, « Dystrophin is required for the formation of stable muscle attachments in the zebrafish embryo », *Development*, vol. 130, n° 23, p. 5851-5860, déc. 2003.
- [40] L. S. Steffen *et al.*, « Zebrafish orthologs of human muscular dystrophy genes », *BMC Genomics*, vol. 8, n° 1, p. 79, 2007.

- [41] J. Berger, S. Berger, T. E. Hall, G. J. Lieschke, et P. D. Currie, « Dystrophin-deficient zebrafish feature aspects of the Duchenne muscular dystrophy pathology », *Neuromuscul. Disord.*, vol. 20, n° 12, p. 826-832, déc. 2010.
- [42] J. Berger, S. Berger, A. S. Jacoby, S. D. Wilton, et P. D. Currie, « Evaluation of exon-skipping strategies for Duchenne muscular dystrophy utilizing dystrophin-deficient zebrafish », *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 15, n° 12, p. 2643-2651, déc. 2011.
- [43] M. Granato *et al.*, « Genes controlling and mediating locomotion behavior of the zebrafish embryo and larva », *Development*, vol. 123, n° 1, p. 399–413, 1996.
- [44] R. Sitnik *et al.*, « Novel point mutations in the dystrophin gene », *Hum. Mutat.*, vol. 10, n° 3, p. 217-222, janv. 1997.
- [45] G. J. Lieschke et P. D. Currie, « Animal models of human disease: zebrafish swim into view », *Nat Rev Genet*, vol. 8, n° 5, p. 353-367, mai 2007.
- [46] S. Neuman, A. Kaban, T. Volk, D. Yaffe, et U. Nudel, « The dystrophin/utrophin homologues in *Drosophila* and in sea urchin », *Gene*, vol. 263, n° 1, p. 17–29, 2001.
- [47] H. R. Shcherbata *et al.*, « Dissecting muscle and neuronal disorders in a *Drosophila* model of muscular dystrophy », *EMBO J.*, vol. 26, n° 2, p. 481–493, 2007.
- [48] K. Gieseler, M. Abdel-Dayem, et L. Ségalat, « In vitro interactions of *Caenorhabditis elegans* dystrophin with dystrobrevin and syntrophin », *FEBS Lett.*, vol. 461, n° 1-2, p. 59–62, 1999.
- [49] O. Nyamsuren, D. Faggionato, W. Loch, E. Schulze, et R. Baumeister, « A mutation in CHN-1/CHIP suppresses muscle degeneration in *Caenorhabditis elegans* », *Dev. Biol.*, vol. 312, n° 1, p. 193-202, déc. 2007.
- [50] K. Gieseler, K. Grisoni, et L. Ségalat, « Genetic suppression of phenotypes arising from mutations in dystrophin-related genes in *Caenorhabditis elegans* », *Curr. Biol.*, vol. 10, n° 18, p. 1092–1097, 2000.
- [51] D. R. Love, « An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin », *Nature*, vol. 339, p. 55-58, 1989.
- [52] D. Duan, « Duchenne muscular dystrophy gene therapy: Lost in translation? », *Res. Rep. Biol.*, p. 31, mars 2011.
- [53] S. Böhm, H. Jin, S. M. Hughes, R. G. Roberts, et Y. Hinits, « Dystrobrevin and dystrophin family gene expression in zebrafish », *Gene Expr. Patterns*, vol. 8, n° 2, p. 71-78, janv. 2008.
- [54] A. Aartsma-Rus, J. C. T. Van Deutekom, I. F. Fokkema, G.-J. B. Van Ommen, et J. T. Den Dunnen, « Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: An overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule », *Muscle Nerve*, vol. 34, n° 2, p. 135-144, août 2006.
- [55] S. Tuffery-Giraud *et al.*, « Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase », *Hum. Mutat.*, vol. 30, n° 6, p. 934-945, juin 2009.
- [56] S. Hamed, A. Sutherland-Smith, J. Gorospe, J. Kendrick-Jones, et E. Hoffman, « DNA sequence analysis for structure/function and mutation studies in Becker muscular dystrophy: DNA sequence analysis for structure/function and mutation studies », *Clin. Genet.*, vol. 68, n° 1, p. 69-79, mai 2005.
- [57] I. Desguerre *et al.*, « Clinical Heterogeneity of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD): Definition of Sub-Phenotypes and Predictive Criteria by Long-Term Follow-Up », *PLoS ONE*, vol. 4, n° 2, p. e4347, févr. 2009.
- [58] C. E. Ambrosio *et al.*, « Identification of three distinguishable phenotypes in golden retriever muscular dystrophy », *Genet Mol Res*, vol. 8, n° 2, p. 389–396, 2009.
- [59] A. Nakamura et S. 'ichi Takeda, « Mammalian Models of Duchenne Muscular Dystrophy: Pathological Characteristics and Therapeutic Applications », *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2011, p. 1-8, 2011.
- [60] M. Durbeej et K. P. Campbell, « Muscular dystrophies involving the dystrophin–glycoprotein complex: an overview of current mouse models », *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 12, n° 3, p. 349–361, 2002.

- [61] M. J. Spencer et J. G. Tidball, « Do immune cells promote the pathology of dystrophin-deficient myopathies? », *Neuromuscul. Disord.*, vol. 11, n° 6, p. 556–564, 2001.
- [62] S. Fukada *et al.*, « Genetic Background Affects Properties of Satellite Cells and mdx Phenotypes », *Am. J. Pathol.*, vol. 176, n° 5, p. 2414-2424, mai 2010.
- [63] S. Decary, C. B. Hamida, V. Mouly, J. P. Barbet, F. Hentati, et G. S. Butler-Browne, « Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children », *Neuromuscul. Disord.*, vol. 10, n° 2, p. 113–120, 2000.
- [64] K. Chandrasekharan *et al.*, « A Human-Specific Deletion in Mouse Cmah Increases Disease Severity in the mdx Model of Duchenne Muscular Dystrophy », *Sci. Transl. Med.*, vol. 2, n° 42, p. 42ra54-42ra54, juill. 2010.
- [65] C. E. Ambrósio *et al.*, « Ringo, a Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dog with absent dystrophin but normal strength », *Neuromuscul. Disord.*, vol. 18, n° 11, p. 892-893, 2008.
- [66] M. Vainzof et M. Zatz, « Protein defects in neuromuscular diseases », *Braz. J. Med. Biol. Res.*, vol. 36, n° 5, p. 543–555, 2003.
- [67] M. Sifringer *et al.*, « Identification of transcripts from a subtraction library which might be responsible for the mild phenotype in an intrafamilially variable course of Duchenne muscular dystrophy », *Hum. Genet.*, vol. 114, n° 2, p. 149-156, 2004.
- [68] M. F. Lyon, « Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome », *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 14, n° 2, p. 135, 1962.
- [69] C. M. McDonald *et al.*, « The 6-minute walk test in Duchenne/Becker muscular dystrophy: Longitudinal observations », *Muscle Nerve*, vol. 42, n° 6, p. 966–974, 2010.
- [70] G. C. Liu, Y. J. Jong, C. H. Chiang, et T. S. Jaw, « Duchenne muscular dystrophy: MR grading system with functional correlation. », *Radiology*, vol. 186, n° 2, p. 475-480, févr. 1993.
- [71] J.-L. Thibaud, A. Monnet, D. Bertoldi, I. Barthélémy, S. Blot, et P. G. Carlier, « Characterization of dystrophic muscle in golden retriever muscular dystrophy dogs by nuclear magnetic resonance imaging », *Neuromuscul. Disord.*, vol. 17, n° 7, p. 575-584, 2007.
- [72] B. Valentine, J. Kornegay, et B. Cooper, « Clinical electromyographic studies of canine X-linked muscular dystrophy », *Am. J. Vet. Res.*, vol. 50, n° 12, p. 2145–2147, déc. 1989.
- [73] F. P. Gaschen *et al.*, « Dystrophin deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats », *J. Neurol. Sci.*, vol. 110, n° 1–2, p. 149-159, juill. 1992.
- [74] G. D. Shelton et E. Engvall, « Canine and feline models of human inherited muscle diseases », *Neuromuscul. Disord.*, vol. 15, n° 2, p. 127-138, févr. 2005.
- [75] N. M. Johnson, G. H. Farr, et L. Maves, « The HDAC Inhibitor TSA Ameliorates a Zebrafish Model of Duchenne Muscular Dystrophy », *PLoS Curr.*, 2013.
- [76] J. Berger, T. Sztal, et P. D. Currie, « Quantification of birefringence readily measures the level of muscle damage in zebrafish », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 423, n° 4, p. 785-788, juill. 2012.
- [77] R. L. Carroll, *Vertebrate ancestor, Vertebrate Paleontology and Evolution. W. H. Freeman. NY. 1988.*
- [78] C. P. Christoforou, C. E. Greer, B. R. Challoner, D. Charizanos, et R. P. Ray, « The detached locus encodes Drosophila Dystrophin, which acts with other components of the Dystrophin Associated Protein Complex to influence intercellular signalling in developing wing veins », *Dev. Biol.*, vol. 313, n° 2, p. 519-532, janv. 2008.
- [79] KimvdLinde, *Drosophila appendiculata wing*. 2010.
- [80] O. Taghli-Lamalle, K. Jagla, J. S. Chamberlain, et R. Bodmer, « Mechanical and non-mechanical functions of Dystrophin can prevent cardiac abnormalities in Drosophila », *Exp. Gerontol.*, vol. 49, p. 26-34, janv. 2014.
- [81] A. Gaud, J.-M. Simon, T. Witzel, M. Carre-Pierrat, C. G. Wermuth, et L. Ségalat, « Prednisone reduces muscle degeneration in dystrophin-deficient *Caenorhabditis elegans* », *Neuromuscul. Disord.*, vol. 14, n° 6, p. 365-370, juin 2004.

- [82] C. Beron, A. G. Vidal-Gadea, J. Cohn, A. Parikh, G. Huong, et J. T. Pierce-Shimomura, « The burrowing behavior of the nematode *Caenorhabditis elegans*: A new assay for the study of neuromuscular disorders », *Genes Brain Behav.*, vol. 14, n° 4, p. 357-368, avr. 2015.
- [83] N. Brouilly *et al.*, « Ultra-structural time-course study in the *C. elegans* model for Duchenne muscular dystrophy highlights a crucial role for sarcomere-anchoring structures and sarcolemma integrity in the earliest steps of the muscle degeneration process », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 24, n° 22, p. 6428-6445, nov. 2015.
- [84] A. Romfh et E. M. McNally, « Cardiac Assessment in Duchenne and Becker Muscular Dystrophies », *Curr. Heart Fail. Rep.*, vol. 7, n° 4, p. 212-218, 2010.
- [85] D. G. Allen et N. P. Whitehead, « Duchenne muscular dystrophy – What causes the increased membrane permeability in skeletal muscle? », *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 43, n° 3, p. 290-294, mars 2011.
- [86] F. Gaschen *et al.*, « Lethal Peracute Rhabdomyolysis Associated with Stress and General Anesthesia in Three Dystrophin-deficient Cats », *Vet. Pathol. Online*, vol. 35, n° 2, p. 117-123, mars 1998.
- [87] D. M. Fine *et al.*, « Age-matched comparison reveals early electrocardiography and echocardiography changes in dystrophin-deficient dogs », *Neuromuscul. Disord.*, vol. 21, n° 7, p. 453-461, juill. 2011.
- [88] R. G. F. Hendriksen, G. Hoogland, S. Schipper, J. G. M. Hendriksen, J. S. H. Vles, et M. W. Aalbers, « A possible role of dystrophin in neuronal excitability: A review of the current literature », *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 51, p. 255-262, avr. 2015.
- [89] M. Sekiguchi, « The role of dystrophin in the central nervous system: a mini review », *Acta Myol. Myopathies Cardiomyopathies Off. J. Mediterr. Soc. Myol. Ed. Gaetano Conte Acad. Study Striated Muscle Dis.*, vol. 24, n° 2, p. 93–97, oct. 2005.
- [90] B. Nichols, S. Takeda, et T. Yokota, « Nonmechanical Roles of Dystrophin and Associated Proteins in Exercise, Neuromuscular Junctions, and Brains », *Brain Sci.*, vol. 5, n° 3, p. 275-298, sept. 2015.
- [91] J. Manning *et al.*, « Amitriptyline is efficacious in ameliorating muscle inflammation and depressive symptoms in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy », *Exp. Physiol.*, vol. 99, n° 10, p. 1370-1386, oct. 2014.
- [92] M. C. van der Plas, « Dystrophin Is Required for Appropriate Retrograde Control of Neurotransmitter Release at the *Drosophila* Neuromuscular Junction », *J. Neurosci.*, vol. 26, n° 1, p. 333-344, janv. 2006.
- [93] J. P. Ennen, M. Verma, et A. Asakura, « Vascular-targeted therapies for Duchenne muscular dystrophy », *Skelet. Muscle*, vol. 3, n° 1, p. 1, 2013.
- [94] H. Stedman *et al.*, « The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy », *Nature*, vol. 352, n° 6335, p. 536–539, août 1991.
- [95] Rossi, Axel et Salvetti, Anna, « Intégration des vecteurs AAV et mutagenèse insertionnelle », *Med Sci Paris*, vol. 32, n° 2, p. 167-174, 2016.
- [96] B. R. Jones *et al.*, « Muscular dystrophy with truncated dystrophin in a family of Japanese Spitz dogs », *J. Neurol. Sci.*, vol. 217, n° 2, p. 143-149, févr. 2004.
- [97] G. E. Crawford, J. A. Faulkner, R. H. Crosbie, K. P. Campbell, S. C. Froehner, et J. S. Chamberlain, « Assembly of the dystrophin-associated protein complex does not require the dystrophin COOH-terminal domain », *J. Cell Biol.*, vol. 150, n° 6, p. 1399–1410, 2000.
- [98] S. B. England *et al.*, « Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin », *Nature*, vol. 343, n° 6254, p. 180-182, janv. 1990.
- [99] D. J. Wells *et al.*, « Expression of human full-length and minidystrophin in transgenic mdx mice: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 4, n° 8, p. 1245-1250, août 1995.
- [100] D. Duan, « Duchenne Muscular Dystrophy Gene Therapy in the Canine Model », *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.*, vol. 26, n° 1, p. 57-69, mars 2015.

- [101] G. B. Banks, L. M. Judge, J. M. Allen, et J. S. Chamberlain, « The Polyproline Site in Hinge 2 Influences the Functional Capacity of Truncated Dystrophins », *PLoS Genet.*, vol. 6, n° 5, p. e1000958, mai 2010.
- [102] H. Foster *et al.*, « Codon and mRNA Sequence Optimization of Microdystrophin Transgenes Improves Expression and Physiological Outcome in Dystrophic mdx Mice Following AAV2/8 Gene Transfer », *Mol Ther.*, vol. 16, n° 11, p. 1825-1832, sept. 2008.
- [103] J.-H. Shin *et al.*, « Microdystrophin Ameliorates Muscular Dystrophy in the Canine Model of Duchenne Muscular Dystrophy », *Mol. Ther.*, vol. 21, n° 4, p. 750-757, avr. 2013.
- [104] G. A. Cox *et al.*, « Overexpression of dystrophin in transgenic mdx mice eliminates dystrophic symptoms without toxicity », *Nature*, vol. 364, n° 6439, p. 725-729, août 1993.
- [105] M. Neri *et al.*, « Dystrophin levels as low as 30% are sufficient to avoid muscular dystrophy in the human », *Neuromuscul. Disord.*, vol. 17, n° 11–12, p. 913-918, déc. 2007.
- [106] C. Le Guiner *et al.*, « Forelimb Treatment in a Large Cohort of Dystrophic Dogs Supports Delivery of a Recombinant AAV for Exon Skipping in Duchenne Patients », *Mol. Ther.*, vol. 22, n° 11, p. 1923-1935, nov. 2014.
- [107] M. Tabebordbar *et al.*, « In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells », *Science*, vol. 351, n° 6271, p. 407-411, janv. 2016.
- [108] J. F. Wright, « Manufacturing and characterizing AAV-based vectors for use in clinical studies », *Gene Ther.*, vol. 15, n° 11, p. 840–848, 2008.
- [109] E. Basner-Tschakarjan et F. Mingozzi, « Cell-Mediated Immunity to AAV Vectors, Evolving Concepts and Potential Solutions », *Front. Immunol.*, vol. 5, p. 350, 2014.
- [110] J. N. Kornegay *et al.*, « Widespread Muscle Expression of an AAV9 Human Mini-dystrophin Vector After Intravenous Injection in Neonatal Dystrophin-deficient Dogs », *Mol. Ther.*, vol. 18, n° 8, p. 1501-1508, août 2010.
- [111] V. Arechavala-Gomez *et al.*, « Revertant fibres and dystrophin traces in Duchenne muscular dystrophy: Implication for clinical trials », *Neuromuscul. Disord.*, vol. 20, n° 5, p. 295-301, mai 2010.
- [112] R. Kawano, M. Ishizaki, Y. Maeda, Y. Uchida, E. Kimura, et M. Uchino, « Transduction of Full-length Dystrophin to Multiple Skeletal Muscles Improves Motor Performance and Life Span in Utrophin/Dystrophin Double Knockout Mice », *Mol. Ther.*, vol. 16, n° 5, p. 825-831, mars 2008.
- [113] W. Lostal, K. Kodippili, Y. Yue, et D. Duan, « Full-Length Dystrophin Reconstitution with Adeno-Associated Viral Vectors », *Hum. Gene Ther.*, vol. 25, n° 6, p. 552-562, juin 2014.
- [114] D. Duan, « From the Smallest Virus to the Biggest Gene: Marching Towards Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy », *Discov. Med.*, vol. 6, n° 33, p. 103-108, juin 2006.
- [115] Rachel Millet, Axel Rossi, Aurélie Ploquin, Alberto L. Epstein, Anna Greco, Anna Salvetti, « Les vecteurs AAV pour le transfert de gène in vivo ou comment un petit virus devient grand. *Virologie*. 2013;17(5):343-353. »
- [116] J. Li *et al.*, « Hydrodynamic limb vein injection of AAV9 results in regional and systemic long-term expression of minidystrophin in young adult GRMD dogs », présenté à MOLECULAR THERAPY, 2009, vol. 17, p. S278-S278.
- [117] « Première étape vers un nouvel outil pour le traitement de la myopathie ». COMMUNIQUÉ – SALLE DE PRESSE INSERM, février-2015.
- [118] A. Goyenvalle *et al.*, « Le saut d'exon thérapeutique: un espoir pour les dystrophinopathies », *MS Médecine Sci.*, vol. 20, n° 12, p. 1163–1165, 2004.
- [119] A. Goyenvalle, A. Babbs, G.-J. B. van Ommen, L. Garcia, et K. E. Davies, « Enhanced Exon-skipping Induced by U7 snRNA Carrying a Splicing Silencer Sequence: Promising Tool for DMD Therapy », *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 17, n° 7, p. 1234-1240, juill. 2009.
- [120] A. Goyenvalle *et al.*, « Rescue of severely affected dystrophin/utrophin-deficient mice through scAAV-U7snRNA-mediated exon skipping », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 21, n° 11, p. 2559-2571, juin 2012.
- [121] A. Aartsma-Rus *et al.*, « Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations », *Hum. Mutat.*, vol. 30, n° 3, p. 293-299, mars 2009.

- [122] T. Yokota *et al.*, « Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in duchenne dystrophy dogs », *Ann. Neurol.*, vol. 65, n° 6, p. 667–676, 2009.
- [123] Y. Aoki *et al.*, « Bodywide skipping of exons 45-55 in dystrophic mdx52 mice by systemic antisense delivery », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, n° 34, p. 13763-13768, août 2012.
- [124] A. Goyenvalle *et al.*, « Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers », *Nat. Med.*, vol. 21, n° 3, p. 270-275, mars 2015.
- [125] A. Goyenvalle, G. Griffith, A. Avril, H. Amthor, et L. Garcia, « Un nouvel outil pour le traitement de la myopathie de Duchenne : les tricyclo-ADN », *médecine/sciences*, vol. 31, n° 3, p. 253-256, mars 2015.
- [126] S. W. Peltz, M. Morsy, E. M. Welch, et A. Jacobson, « Ataluren as an agent for therapeutic nonsense suppression », *Annu. Rev. Med.*, vol. 64, p. 407-425, 2013.
- [127] M. Li, M. Andersson-Lendahl, T. Sejersen, et A. Arner, « Muscle dysfunction and structural defects of dystrophin-null sapje mutant zebrafish larvae are rescued by ataluren treatment », *FASEB J.*, vol. 28, n° 4, p. 1593-1599, avr. 2014.
- [128] E. M. Welch *et al.*, « PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations », *Nature*, vol. 447, n° 7140, p. 87-91, mai 2007.
- [129] C. Bertoni, « Emerging gene editing strategies for Duchenne muscular dystrophy targeting stem cells », *Front. Physiol.*, vol. 5, p. 148, 2014.
- [130] D. G. Ousterout, A. M. Kabadi, P. I. Thakore, W. H. Majoros, T. E. Reddy, et C. A. Gersbach, « Multiplex CRISPR/Cas9-Based Genome Editing for Correction of Dystrophin Mutations that Cause Duchenne Muscular Dystrophy », *Nat. Commun.*, vol. 6, p. 6244-6244, 2015.
- [131] C. E. Nelson *et al.*, « In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy », *Science*, vol. 351, n° 6271, p. 403, janv. 2016.
- [132] C. Long *et al.*, « Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy », *Science*, vol. 351, n° 6271, p. 400-403, janv. 2016.
- [133] Myoinfo, département d'information sur les maladies neuromusculaires de l'AFM-Téléthon, Evry, « Avancées dans les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker ». Savoir & Comprendre, juin-2016.
- [134] G. Kawahara et L. M. Kunkel, « Zebrafish based small molecule screens for novel DMD drugs », *Drug Discov. Today Technol.*, vol. 10, n° 1, p. e91-e96, mars 2013.
- [135] M. Pantoja et H. Ruohola-Baker, « Drosophila as a starting point for developing therapeutics for the rare disease Duchenne Muscular Dystrophy », *Rare Dis.*, vol. 1, p. e24995, 2013.
- [136] J. M. K. Liu, C. S. Okamura, D. J. Bogan, J. R. Bogan, M. K. Childers, et J. N. Kornegay, « Effects of prednisone in canine muscular dystrophy », *Muscle Nerve*, vol. 30, n° 6, p. 767-773, déc. 2004.
- [137] S. Vianello *et al.*, « Arginine butyrate: a therapeutic candidate for Duchenne muscular dystrophy », *FASEB J.*, vol. 27, n° 6, p. 2256-2269, juin 2013.
- [138] J. R. Terrill, G. J. Pinniger, J. A. Graves, M. D. Grounds, et P. G. Arthur, « Increasing taurine intake and taurine synthesis improves skeletal muscle function in the mdx mouse model for Duchenne muscular dystrophy », *J. Physiol.*, vol. 594, n° 11, p. 3095–3110, 2016.
- [139] H. Barzilai-Tutsch, A. Bodanovsky, H. Maimon, M. Pines, et O. Halevy, « Halofuginone promotes satellite cell activation and survival in muscular dystrophies », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.*, vol. 1862, n° 1, p. 1-11, janv. 2016.
- [140] D. Skuk et J. P. Tremblay, « Cell therapy in muscular dystrophies: many promises in mice and dogs, few facts in patients », *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 15, n° 9, p. 1307-1319, sept. 2015.
- [141] T. B. Lessa *et al.*, « Muscle reorganisation through local injection of stem cells in the diaphragm of mdx mice », *Acta Vet Scand*, vol. 54, p. 73, 2012.
- [142] W. Bos, A. E. Westra, W. Pinxten, M. P. Mayer, et J. D. Lantos, « Risks in a Trial of an Innovative Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy », *Pediatrics*, vol. 136, n° 6, p. 1173-1177, déc. 2015.
- [143] « Les enjeux éthiques de la technologie CRISPR-Cas9 ». COMMUNIQUÉ – SALLE DE PRESSE INSERM, juin-2016.
- [144] Association française des hémophiles, *Comment se déroule un essai clinique ? schéma 3.* .

Annexes

Annexe 1 : Les modèles animaux pour les myopathies de Duchenne et de Becker [1]

Non-mammalian	Mutation	Comments	Reference
<i>C. elegans</i>		Various models available.	Reviewed in Chamberlain and Benian, 2000
<i>Drosophila</i>		Various models available.	Reviewed in Lloyd and Taylor, 2010
Zebrafish		Dystrophin-null sapje model has served as an excellent high-throughput system for drug screening.	Reviewed in Kunkel et al., 2006; Berger and Currie, 2012
Murine*	Mutation	Comments	Reference
Dystrophin-deficient mice			
Mdx	Exon 23 point mutation	Most widely used model. On the C57BL/10 background. Available from the Jackson Laboratory (JL#001801).	Bulfield et al., 1984
Albino Mdx	Same as mdx	Mdx on the Albino background.	Krivov et al, 2009
Mdx/BALB/c	Same as mdx	Mdx on the BALB/c background.	Schmidt et al., 2011
Mdx/BL6	Same as mdx	Mdx on the C57BL/6 background. This strain has been used to generate IL-10/dystrophin dko mice (Nitahara-Kasahara et al., 2014) and myostatin/dystrophin dko mice (Wagner et al., 2002).	Duan et al., unpublished
Mdx/C3H	Same as mdx	Mdx on the C3H background.	Schmidt et al., 2011
Mdx/DBA2	Same as mdx	Mdx on the DBA2 background. More severe dystrophic phenotype. Available from the Jackson Laboratory (JL#013141).	Fukada et al., 2010
Mdx/FVB	Same as mdx	Mdx on the FVB background.	Wasala et al., 2015
Mdx2cv	Intron 42 point mutation	Chemically induced mutation. On the C57BL/6 background. Fewer revertant fibers. Available from the Jackson Laboratory (JL#002388).	Chapman et al., 1989
Mdx3cv	Intron 65 point mutation	Chemically induced mutation. On the C57BL/6 background. All dystrophin isoforms are eliminated but a near-full-length dystrophin is expressed at ~5% of the wild type level. Available from the Jackson Laboratory (JL#002377).	Chapman et al., 1989
Mdx4cv	Exon 53 point mutation	Chemically induced mutation. On the C57BL/6 background. Fewer revertant fibers. Available from the Jackson Laboratory (JL#002378).	Chapman et al., 1989
Mdx5cv	Exon 10 point mutation	Chemically induced mutation. On the C57BL/6 background. Skeletal muscle disease is more severe. Available from the Jackson Laboratory (JL#002388).	Chapman et al., 1989
CRKHR1	Unsequenced, dystrophin deficiency confirmed by immunofluorescence staining	ENU chemically induced mutation on the C3H background, screened for and found to have an elevated CK, centrally nucleated myofibers and dystrophin deficiency.	Aigner et al., 2009
Mdx52	Exon 52 deletion	Targeted inactivation. On the C57BL/6 background. Hot-spot mutation.	Araki et al., 1997
Mdx βgeo	Insertion of the β-geo gene trap cassette in intron 63	LacZ replaced the CR and CT domain. All dystrophin isoforms are mutated. The full-length dystrophin-LacZ fusion protein is not detectable but Dp71-LacZ fusion protein can be detected.	Wertz and Füchtbauer., 1998
DMD-null	Entire DMD gene deletion	Generated by Cre-loxP technology.	Kudoh et al., 2005
Dp71-null	Insertion of a β-geo cassette in intron 62. It disrupts Dp71 unique exon 1	Selective elimination of Dp71. Dp71 promoter driven LacZ expression. Similar LacZ expression pattern as mdx βgeo but muscle is not dystrophic. Dp71 deficiency is associated with early cataract formation in mice.	Sarig et al., 1999; Fort et al., 2014
Dup2	Exon 2 duplication	The only duplication mutation model. On the C57BL/6 background.	Wein et al., 2014
Immune deficient mdx mice			
NSG-mdx4cv	Prkdc and IL2rg double deficient on the mdx4cv background	B cell, T cell and NK cell deficient. Innate immunity deficient. Multiple cytokine signaling pathway deficient. NSG mice are available from the Jackson Laboratory (JL#005557).	Arpke et al., 2013
Rag2 ^{-/-} IL2rb ^{-/-} Dmd ^{-/-}	Rag2 and IL2rb double deficient on the mdx βgeo background	B cell, T cell and NK cell deficient. Multiple cytokine signaling pathway deficient. No revertant fiber. Rag2/IL2rb double knock out strain is available from Taconic (#4111).	Bencze et al., 2012; Vallese et al., 2013
Scid mdx	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit deficient (prkdc) on the mdx background	B cell and T cell deficient. Available from the Jackson Laboratory (JL#018018).	Farini et al., 2007
W41 mdx	C-kit receptor deficient on the mdx background	Haematopoietic deficient. Good for study bone marrow cell therapy in the absence of myeloablation by irradiation.	Walsh et al., 2011

Phenotypic dko mice			
$\alpha 7$ /dystrophin dko or $mdx/\alpha 7^{-/-}$	$\alpha 7$ -Integrin/dystrophin double deficient	Severe dystrophic phenotype. Two independent lines exist. One is generated by Mayer and colleagues. The other is generated in the Burkin lab.	Rooney et al., 2006; Guo et al., 2006
$Adbn^{-/-} mdx$	α -Dystrobrevin/dystrophin double deficient	Severe dystrophic phenotype.	Grady et al., 1999
$Cmah$ - mdx	$Cmah$ /dystrophin double deficient	Severe dystrophic phenotype. Humanized model. Available from the the Jackson Laboratory (JL#017929).	Chandrasekharan et al., 2010
d-Dko	δ -Sarcoglycan/dystrophin double deficient	Severe dystrophic phenotype.	Li et al., 2009
$Desmin^{-/-} mdx4cv$	Desmin/dystrophin double deficient	Severe dystrophic phenotype.	Banks et al., 2014
$Dmd^{mdx}/Large^{myd}$	like-glycosyltransferase (LARGE)/dystrophin double deficient	Severe dystrophic phenotype.	Martins et al., 2013
DMD-null; $Adam8^{-/-}$	ADAM8 deficient and entire DMD gene deletion	This mouse is on the DMD-null background (Kudoh et al., 2005). ADAM8 deficiency hinders invasion of neutrophils into the damage myofiber. As a consequence, injured myofibers are not efficiently removed in dystrophin-null muscle.	Nishimura et al., 2014
Dysferlin/dystrophin dko	Dysferlin/dystrophin double deficient	Severe dystrophic phenotype. Two independent lines exist. One is a cross between naturally occurring dysferlin-null A/J mice and $mdx5cv$ mice. The other is a cross between dysferlin knockout mice and mdx mice.	Han et al., 2011; Hosur et al., 2012
$IL-10^{-/-}/mdx$	Interleukin-10/dystrophin double deficient	Severe dystrophic phenotype. Prominent cardiomyopathy.	Nitahara-Kasahara et al., 2014
mdx/mTR	Telomerase RNA/dystrophin double deficient	Severe dystrophic phenotype. Two strains available at the Jackson Laboratory. One is on the $mdx4cv$ background (JL#023535). The other is on the mdx background (JL#018915).	Sacco et al., 2010
$mdx:MyoD^{-/-}$	MyoD/dystrophin double deficient	Severe dystrophic phenotype. MyoD is only expressed in skeletal muscle. Interestingly, dko mice show severe dilated cardiomyopathy.	Megency et al., 1996
$mdx:utrophin^{-/-}$ (Grady strain) or $mdx/utrophin^{-/-}$ (Deconinck strain)	Utrophin/dystrophin double deficient	Severe dystrophic phenotype. Two independent strains exist. Both are available at the Jackson Laboratory. In the Grady strain (Utrnml1rs Dmdmdx), all utrophin isoforms are inactivated by a targeted mutation at the utrophin CR domain (JL#016622). In the Deconinck strain (Utrnml1ked Dmdmdx), only the largest utrophin isoform is inactivated by a targeted mutation at utrophin exon 7 (JL#014563).	Deconinck et al., 1997; Grady et al., 1997
$PAI-1^{-/-} mdx$	Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)/dystrophin double deficient	Dko mice show early onset fibrosis and higher CK than mdx .	Ardite et al., 2012
Dko mice with phenotype similar to mdx			
$msDKO$	Cytosolic γ -actin/dystrophin double deficient	Phenotype similar to that of mdx .	Prins et al., 2008
$iNOS$ -null mdx or $iNOS/Dys$ DKO	$iNOS$ /dystrophin double deficient	Phenotype similar to that of mdx . Two independent strains exist. The Tidball lab strain is on the mdx background. The Duan lab strain is on the $mdx4cv$ background.	Villalta et al., 2009; Li et al., 2011a
$PVKO$ - mdx	Parvalbumin/dystrophin double deficient	Phenotype similar to that of mdx .	Raymackers et al., 2003
Dko mice with reduced disease			
$cIAP1^{-/-}; mdx$	Cellular inhibitor of apoptosis 1 (cIAP1)/dystrophin double deficient	Reduced disease. Soleus pathology reduced. Diaphragm function improved.	Enwere et al., 2013
$Fib^{-/-} mdx$	Fibrinogen/dystrophin double deficient	Reduced disease. Inflammation and degeneration reduced. Regeneration, grip strength and treadmill improved.	Vidal et al., 2012
$Finp1^{-/-} mdx4CV$	Folliculin interacting protein-1 (Fnip1) deficient mice on the $mdx4cv$ background.	Disease reduced due to $Finp1$ -deficiency associated switch to type I fiber. Central nucleation and the CK level are reduced. Membrane integrity improved.	Reyes et al., 2014 December 29 (online publication ahead of print)
Mdx - $casp$	Caspase-12/dystrophin double deficient	Reduced disease. Muscle force improved. Myofiber degeneration reduced but central nucleation, CK and fibrosis not changed.	Moorwood and Barton et al., 2014
$mdx/Mkp5^{-/-}$	Mitogen-activated protein kinases phosphatase-5 (Mkp5)/dystrophin double deficient	Reduced disease. Reduced degeneration, CK. Improved regeneration, grip strength and EDL force.	Shi et al., 2013
$mdx/myd88^{-/-}$	Myeloid differentiation primary response protein 88 (myd88)/dystrophin double deficient	Reduced disease. Skeletal muscle disease is reduced in 12-m-old mice but not in 2 to 4-m-old mice. Heart disease is reduced in 10 to 12-m-old mice.	Henriques-Pons et al., 2014
$mdx/q^{-/-}$	Protein kinase C α (PKC α)/dystrophin double deficient	Reduced disease. Reduced degeneration and inflammation. Improved regeneration and treadmill performance.	Madaro et al., 2012
$mdx/sgk1^{-/-}$	Serum-and glucocorticoid-induced kinase 1 (sgk1) and dystrophin double deficient	Reduced disease. Improved specific force, muscle fatigueability, and histology. Normalization of fibrosis.	Steinberger et al., 2014
mdx - $Xist^{dhs}$	$Xist$ /dystrophin double knockout	Variable level of dystrophin expression as low as 5%.	van Putten et al., 2013
$Mstn^{-/-}/mdx$	Myostatin/dystrophin double deficient	Reduced disease. Limb muscle is more muscular and stronger. Diaphragm fibrosis is reduced.	Wagner et al 2002

OPN DMM	Osteopontin (OPN)/dystrophin double deficient	Reduced disease. Improved regeneration and grip strength. Reduced inflammation and fibrosis.	Vetrone et al., 2009
Transgenic mdx mice			
Full-length dystrophin transgenic mdx	Transgenic over-expression of full-length dystrophin in the mdx background	Multiple lines were generated by different labs. All show protection. 50-fold over-expression is not toxic to skeletal muscle.	Cox et al., 1993; Phelps et al., 1995; Wells et al., 1995
Dp71 transgenic mdx	Transgenic over-expression of Dp71 in the mdx background	More severe disease confirmed by two independent lines made in two different labs.	Cox et al., 1994; Greenberg et al., 1994
Dp116 transgenic mdx4cv	Transgenic over-expression of Dp116 in the mdx4cv background	More severe disease.	Judge et al., 2006
Dp116:mdx:utrophin ^{-/-}	Transgenic over-expression of Dp116 in the utrophin/dystrophin dko background	Improved growth, mobility and lifespan but no change in histopathology, specific force and CK.	Judge et al., 2011
Dp260 transgenic mdx	Transgenic over-expression of Dp260 in the mdx background	Reduced but not completely prevented histopathology. Improved resistance to eccentric contraction injury but did not improve specific force.	Warner et al., 2002
Dp260 in mdx/utrn ^{-/-}	Transgenic over-expression of Dp260 in the utrophin/dystrophin dko background	Severe lethal phenotype is converted to mild myopathy.	Gaedigk et al., 2006
Δ17-48 transgenic mdx	Transgenic over-expression of the naturally occurring Δ17-48 mini-dystrophin gene in the mdx background	Two independent lines were generated. Both showed muscle protection.	Phelps et al., 1995; Wells et al., 1992 and 1995
ΔH2-R19 transgenic mdx	Transgenic over-expression of the synthetic ΔH2-R19 mini-dystrophin gene in the mdx background	Completely reduced histopathology and normalized muscle force but did not restore sarcolemmal nNOS.	Harper et al., 2002
Cardiac-specific ΔH2-R19 transgenic mdx	Transgenic over-expression of the synthetic ΔH2-R19 mini-dystrophin gene in the heart of mdx mice	Effectively protected but did not fully normalize the heart.	Bostick et al., 2009
ΔH2-R15 transgenic mdx	Transgenic over-expression of the synthetic ΔH2-R15 mini-dystrophin gene in the mdx background	Complete correction of the dystrophic phenotype including nNOS and functional ischemia.	Lai et al., 2009; Hakim and Duan 2013
Micro-dystrophin transgenic	Transgenic over-expression of various synthetic micro-dystrophin genes in the mdx background	Many lines are established for different microgenes. ΔR4-23 and ΔR4-23/C yield excellent protection but they don't restore nNOS. Hinge 2 in these two microgenes compromises function. ΔR2-15/R18-19/R20-23/C contains hinge 3 and is the only microgene capable of restoring nNOS.	Harper et al., 2002; Li et al., 2011b; Sakamoto et al., 2002; Hakim et al., 2013; Wang et al., 2008; Ferrer et al 2004
Fiona	Transgenic over-expression of full-length utrophin in the mdx background	Excellent protection but does not restore nNOS.	Tinsley et al., 1998; Li et al., 2010
Laminin α1 transgenic mdx	Transgenic over-expression of the laminin α1 chain in the mdx background	Used to study laminin-111 protein therapy. Phenotype appeared to be very similar to mdx, without any benefit or harm.	Gawlik et al., 2011
Canine			
Alaskan malamute dystrophic dog	Mutation	Comments	References
Alaskan malamute dystrophic dog	Unknown but dystrophin deficiency is confirmed	Case report.	Ito et al., 2011
CKCS-MD	Intron 50 point mutation resulting in exon 50 exclusion from the mRNA	Spontaneous mutation in the Cavalier King Charles Spaniel (CKCS) breed. Small breed. Hot-spot mutation. Colony maintained at Royal Veterinary College, UK.	Walmsley et al., 2010
Cocker spaniel dystrophic dog	Deletion of four nucleotides in exon 65	No colony established.	Kornegay et al., 2012
CXMDj	Same as GRMD	GRMD crossed to the beagle background. Small breed. Reduced phenotype. Colony maintained at the National Center of Neurology and Psychiatry, Japan.	Shimatsu et al., 2003
GLRMD	Same as GRMD	Hybrid background of golden retriever and Labrador retriever.	Miyazato et al., 2011
Grand Basset Griffon Vendeen dystrophic dog	Unknown but dystrophin deficiency is confirmed	Case report.	Klarenbeek et al., 2007
GRMD	Intron 6 point mutation resulting in the exclusion of exon 7 from the mRNA	Spontaneous mutation in the golden retriever (GR) breed. Similar disease as human patients. Most widely used dog model. Multiple colonies exist worldwide.	Valentine et al., 1986; Cooper et al., 1988; Kornegay et al., 1988
GSHP MD	Whole gene deletion	Spontaneous mutation in the German short haired pointer (GSHP) breed.	Schatzberg et al., 1999
Hybrid cDMD dogs with mixed genetic background and multiple mutations	Various	Generated by artificial insemination by crossing different cDMD breeds. Resembles genetic diversity seen in human patients.	Fine et al., 2011; Miyazato et al., 2011; Shin et al., 2013a; Shin et al 2013b; Yang et al 2012;
Japanese spitz dystrophic dog	Inversion between intron 19 of dystrophin gene and retinitis pigmentosa GTPase regulator gene (RPGN)	Case report.	Jones et al., 2004; Atencia-Fernandez et al., 2015
Labrador Retriever BMD dog	Unknown	Case report. Low-level uniform expression of a ~135 kDa dystrophin protein. Mild phenotype. This is the only reported BMD dog case.	Baroncelli et al., 2014
Labrador Retriever dystrophic dog	Unknown but dystrophin deficiency is confirmed	Case report.	Bergman et al., 2002
Labrador Retriever dystrophic dog	Repetitive element insertion in intron 19	Spontaneous mutation. Colony maintained at the University of Missouri and Auburn University.	Smith et al., 2007

Lurcher dystrophic dog	Unknown but dystrophin deficiency is confirmed	Case report of two pups in the same litter. Possible response to L-carnitine supplementation in one of the pups.	Giannasi et al., 2015
Miniature schnauzer dystrophic dog	Unknown but dystrophin deficiency is confirmed	Case report.	Paola et al., 1993
Norfolk Terrier dystrophy	Unknown but dystrophin deficiency is confirmed	No colony established.	Beltran et al., 2014
Old English sheepdog dystrophic dog	Unknown but dystrophin deficiency is confirmed	Case report.	Wieczorek et al., 2006
Rat terrier dystrophic dog	Unknown but dystrophin deficiency is confirmed	Case report. Unusual hypertrophic presentation in the cervical and proximal limb muscles.	Wetterman et al., 2000
Rottweiler dystrophic dog	Nonsense point mutation in exon 58	No colony established.	Kornegay et al., 2012; Winand et al 1994b
Tibetan terrier dystrophic dog	Exons 8-29 deletion	No colony established.	Kornegay et al., 2012
Weimaraner dystrophic dog	Unknown but dystrophin deficiency is confirmed	Case report.	Baltzer et al., 2007
Welsh Corgi MD	LINE-1 insertion in intron 13	Spontaneous mutation. Colony maintained at the University of Missouri and Auburn University.	Smith et al., 2011

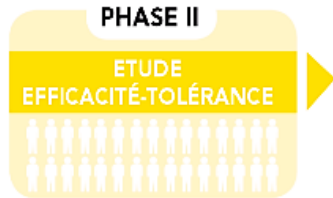
Other Mammalian	Mutation	Comments	References
DMD rat #1	Exon 3-6 deletion using the CRISPR/Cas technology	New model.	Nakamura et al., 2014
DMD rat #2	Frame shifting 11 bp deletion in exon 23 using TALEN technology, creates premature stop codon	New model. 5% revertant fiber expression. More severe skeletal muscle fibrosis than <i>mdx</i> . Fibrotic lesions in myocardium, though showed concentric hypertrophy rather than eccentric.	Larcher et al., 2014
DMD cat #1	Dp427 promoter and exon 1 deletion	Spontaneous mutation. Prominent muscle hypertrophy. Independent cases have been reported in USA and UK.	Winand et al., 1994a; Carpenter et al., 1989; Blunden and Gower., 2011
DMD cat #2	Similar but not identical deletion as in DMD cat #1	Spontaneous mutation. Primary symptom is regurgitation due to megaesophagus. However, there is no muscle hypertrophy.	Gambino et al., 2014
BMD pig	Exon 41 missense mutation (changing arginine to tryptophan)	Spontaneous mutation. Dystrophin expression is reduced to ~30% of normal. The primary clinical manifestation is stress-induced sudden death. Minimum dystrophic symptom.	Nonneman et al., 2012
DMD Pig #1	Engineered deletion of exon 52	Hot-spot deletion. Marked utrophin upregulation.	Klymiuk et al., 2013
DMD Pig #2	Cre-LoxP engineered deletion of exon 52.	Hot-spot deletion.	Rogers and Swart., 2014

*, The name of the mouse model is according to the first publication that described the model.

Annexe 2 : Phases cliniques chez l'homme [144].



- 1^{er} test chez l'homme
- Phase menée sur un petit nombre de personnes volontaires, non malades ou malades.
- ➔ Etudier la **toxicité** de la molécule, indépendamment de son effet thérapeutique.
- ➔ Analyser l'**évolution de la molécule** dans l'organisme en fonction du temps (pharmacocinétique) et ce qu'elle fait sur l'être humain (pharmacodynamique).



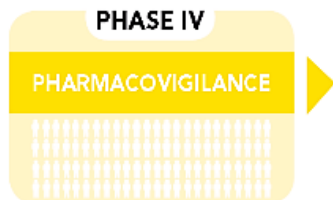
- Phase menée sur environ une centaine de patients volontaires.
- ➔ Rechercher la **plus petite dose efficace** (posologie)
- ➔ Observer d'éventuels **effets secondaires nocifs** en utilisant différentes doses.
- Les essais en phase II et au-delà impliquent une série de tests et des questionnaires à remplir qui vont permettre d'évaluer le traitement.



- Phase menée le plus souvent sur de larges populations de patients (plusieurs centaines à travers le monde). Dans le cas des maladies rares, le nombre de patients est plus restreint.
- Confirmer l'**efficacité** du nouveau médicament déterminé en phase II.
- Comparer son **efficacité** par rapport à un traitement de référence.
- Participants (patients) sélectionnés sur des critères précis afin de répondre à la question de l'efficacité et du bénéfice du médicament testé.
- Durée : parfois plusieurs années.

**Au terme des 3 phases,
 si elles ont été réalisées avec succès
 et montré un rapport
 efficacité/tolérance satisfaisant
 AUTORISATION DE MISE SUR LE MARCHÉ
 DÉLIVRÉE PAR LES AUTORITÉS COMPÉTENTES**

Prescription possible du nouveau traitement



- Amélioration de la stratégie thérapeutique
- Phase de suivi des médicaments
- ➔ Identifier d'**autres effets indésirables** éventuels non mis en évidence préalablement
- Cible : un grand nombre de patients, dans les conditions normales d'utilisation.

NOM PRENOM : SCHOLL VALERIE

Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire : Toulouse, 2016

TITRE : AVANCEES DANS LA COMPREHENSION DES MYOPATHIES DE DUCHENNE ET DE BECKER ET DE LEUR TRAITEMENT A L'AIDE DES MODELES ANIMAUX

RESUME :

Les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker, myopathies les plus répandues chez l'homme et dues à une atteinte du gène DMD, entraînent un manque ou l'absence de la protéine dystrophine, impliquée dans le soutien des fibres musculaires. Actuellement, il n'existe aucun traitement curatif et le traitement standard repose sur l'utilisation de stéroïdes, d'un support palliatif et d'un traitement symptomatique. Les modèles animaux, de l'invertébré au grand mammifère, ont permis de grandement améliorer la compréhension de la fonction biologique de la dystrophine et de la physiopathologie de la myopathie, même si certains aspects, comme l'atteinte neurocognitive, se révèlent être difficilement modélisables. Une large collection de modèles animaux est donc disponible et continue de s'élargir. Ils permettent de rechercher des thérapies géniques, cellulaires ou pharmacologiques, et d'évaluer leur efficacité et leur toxicité. Ils permettent d'établir le principe de base d'un traitement et d'optimiser les protocoles avant et pendant les essais cliniques chez l'homme. Guérir une souris déficiente en dystrophine ne s'avère plus hors de portée, ce qui est fortement encourageant pour les patients DMD.

MOTS CLES : Myopathies de Duchenne et de Becker, modèles animaux, dystrophine, thérapies géniques, cellulaires et pharmacologiques

TITLE : PROGRESS ABOUT THE COMPREHENSION OF DUCHENNE AND BECKER MUSCULAR DYSTROPHIES AND THEIR TREATMENT THANKS TO THE ANIMAL MODELS

ABSTRACT :

Duchenne and Becker muscular dystrophies, the most common myopathies in humans, are due to a mutation in the DMD gene. They lead to the lack or the absence of dystrophin protein, involved in the support of muscular fibers. Currently, there is no cure and the treatment is based on the use of steroids, palliative support and symptomatic treatment. Animal models, from invertebrates to large mammals, have greatly enriched our understanding of the biological function of dystrophin and the pathology of myopathy, even if some aspects, such as neurocognitive deficiency, remain difficult to model. A large and still expanding collection of animal models is available. They enable the search for gene, cellular and pharmacological therapies and to investigate their efficacy and their toxicity. They allow to establish the proof-of-principle of the therapies and to optimize the protocols before and during trials in humans. To cure a dystrophin deficient mouse does not seem out of range anymore, which is very promising for DMD patients.

KEYWORDS : Duchenne and Becker muscular dystrophies, animal models, dystrophin, gene, cellular and pharmacological therapies