

Bases moléculaires des dystrophinopathies

par France Leturcq & Jean-Claude Kaplan

Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire, Hôpital Cochin et Institut Cochin,
123 Boulevard de Port-Royal, 75014 Paris. E-mail : kaplan@cochin.inserm.fr

Reçu le 3 juin 2004

RÉSUMÉ

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une myopathie héréditaire récessive liée au sexe. L'incidence de la maladie est de 1 cas sur 3 500 naissances mâles, ce qui la classe dans la catégorie des maladies dites « orphelines » ou rares (fréquence < 1/2000). Parmi les myopathies, c'est toutefois l'une des plus fréquentes. Elle est observée dans toutes les populations. Cette revue fait le point des avancées spectaculaires dans la connaissance de cette maladie depuis

l'identification du gène responsable en 1986. Celui-ci code une molécule du cytosquelette sub-sarcolemmique, la dystrophine. L'accent est mis sur l'impact de cette découverte sur le diagnostic moléculaire (protéine et lésion de l'ADN). Malgré le temps écoulé depuis la découverte du gène, il n'existe toujours pas de thérapeutique dérivée de cette connaissance. Les différentes perspectives envisagées sont décrites.

SUMMARY Molecular bases of dystrophinopathies

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is inherited in an X-linked recessive pattern and occurs at an incidence of 1 in 3,500 male births, which means that it is a so-called "orphan" or rare disease (frequency < 1/2000). Yet it is one of the most frequent myopathies and is observed in all populations. We review here the spectacular advances made in our understanding of this disease since the identification in 1986

of the responsible gene. This gene encodes a subsarcolemmal component of the cytoskeleton, dystrophin. We consider the impact of this discovery on molecular diagnosis at the protein and DNA levels. Despite the time that has passed since, the discovery of the gene has not led to any treatment, and we review the therapeutic prospect.

LA MALADIE AVANT L'IDENTIFICATION DU GÈNE

Elle a été individualisée entre 1861 et 1868, par Guillaume Benjamin Amand Duchenne, dit Duchenne de Boulogne¹. Cent ans plus tard, juste avant l'avènement de la génétique moléculaire, on disposait d'une bonne connaissance de la *sémiologie clinique* (premiers symptômes d'affaiblissement musculaire avant 5 ans, perte de la marche autour de 10 ans, évolution létale inéluctable vers la fin de la deuxième décennie, par insuffisance respiratoire et cardiaque), de la *morphologie cytologique*

du muscle malade (aspects de dystrophie musculaire, avec mélange de nécrose et de régénération, hyperplasie du tissu conjonctif, et dépôts lipidiques remplaçant progressivement le tissu musculaire atrophié), des anomalies *électro-physiologiques* (tracé de type « myogène » à l'électromyogramme) et *biologiques* (élévation dans le sérum de diverses enzymes d'origine musculaire, notamment de la créatine phosphokinase, ou CPK). Aucun traitement autre que palliatif (lutte contre les rétractions et la scoliose, physiothérapie et assistance respiratoire) n'était possible. L'origine de la maladie était inconnue, et tout ce que l'on savait sur le plan de la génétique était qu'il s'agissait d'une maladie héréditaire, très probablement monogénique, n'atteignant que les garçons, avec une transmission maternelle, caractéristique d'une maladie liée au chromosome X. La détection des femmes transmettrices du trait n'était possible que si le taux de CPK était élevé, ce qui ne se produit que chez deux-tiers des femmes transmettrices obligatoires. Le conseil génétique était donc limité, et le seul diagnostic prénatal proposé se réduisait à l'interruption systématique de toutes

¹ Il fallait le distinguer d'un homonyme, Adolphe Duchesne, médecin très en vogue à l'époque.

La paternité de la maladie est attribuée en Italie à Gaetano Conte (premières descriptions en 1836), et en Grande-Bretagne à Edward Meryon (premières descriptions en 1851). Ce dernier avait bien vu l'atteinte exclusive des garçons avec une transmission exclusivement maternelle ainsi que la nature myogénique de l'affection.

les grossesses mâles. On avait toutefois remarqué l'existence de formes non familiales, et soupçonné l'existence d'un taux élevé de néo-mutations (environ un tiers des cas). On savait, depuis la publication initiale de Paul-Emile Becker (1955), qu'il existait aussi une autre dystrophie musculaire progressive liée au sexe, débutant beaucoup plus tardivement que la myopathie de Duchenne, à l'âge de l'adolescence, ou même à l'âge adulte. Cette dystrophie musculaire, dite de Becker (BMD), s'accompagne aussi d'une élévation de la CPK et de signes histopathologiques de dystrophie musculaire. Son évolution beaucoup plus lente et la bien moindre sévérité du handicap, qui est compatible avec la procréation et l'exercice d'une profession, en faisaient une entité cliniquement bien distincte de la myopathie de Duchenne.

Enfin on avait remarqué l'existence de formes, dites intermédiaires, parce que leur sévérité se situe entre DMD et BMD.

La chasse au gène

Vers la fin des années 70, les nouveaux outils de la génétique moléculaire ayant été mis en place, il devint possible d'accéder à la structure physico-chimique des gènes dans des organismes aussi complexes que celui d'*Homo sapiens*. De plus la découverte de marqueurs polymorphes, véritables balises génétiques, laissait entrevoir la possibilité de repérer puis de mettre le doigt sur les nombreux gènes de maladies non encore identifiés. Étant donné que cette catégorie était très majoritaire (le défaut protéique d'origine génétique n'était connu que dans une dizaine de maladies, comme par exemple l'hémophilie A ou B, les hémoglobinopathies), il fallait définir des priorités. Il est remarquable que, dans un article historique publié en 1980 par quatre généticiens non médecins, spécialistes de la levure et de la *Drosophila*, la myopathie de Duchenne ait figuré, avec la mucoviscidose et la chorée de Huntington, au premier rang des maladies considérées comme prioritaires (Botstein *et al.*, 1980). Ceci se comprend, car l'ignorance complète de son étiologie, l'absence de critères diagnostiques moléculaires permettant d'offrir un conseil génétique, et surtout l'impuissance thérapeutique totale, faisaient de la myopathie de Duchenne une grande cause de la « génétique inverse ». Cette approche consiste à découvrir d'abord quel est le gène muté et à déduire ensuite la séquence de la protéine défectueuse². Des centaines de gènes de maladies ont été identifiées par cette approche, dont la plupart de ceux dont le défaut conduit aux maladies génétiques les plus fréquentes. Maintenant que la séquence à peu près complète du génome humain a été obtenue (3 milliards de paires de bases), les gènes de maladies restant à découvrir seront identifiés par « clonage *in silico* », c'est-à-dire par analyse bio-informatique des séquences génomiques.

² On dit maintenant « clonage positionnel » pour insister sur le fait que l'identification de la séquence génique en cause est précédée par une étape de repérage sur le génome.

Pour trouver le gène DMD on a combiné l'approche cytogénétique (de rarissimes aberrations touchant une certaine région du bras court du chromosome X avaient été trouvées chez des malades atteints de DMD) et l'analyse de liaison par des marqueurs polymorphes. Le premier marqueur lié au locus fut obtenu par une analyse familiale effectuée dans le groupe de Bob Williamson (Murray *et al.*, 1982), confirmant la localisation en Xp21.2. Ceci permit d'aboutir à un résultat inattendu : une liaison, avec une probabilité identique, était observée dans les familles de BMD, suggérant que les deux affections pourraient être « alléliques » (Kingston *et al.*, 1984). La suite devait confirmer que DMD et BMD ne forment qu'un même locus morbide renfermant un même gène, dont des défauts différents expliquent les phénotypes pathologiques (ou « pathotypes ») distincts.

C'est en 1986-1987 que l'équipe de Lou Kunkel (Monaco *et al.*, 1986, 1988; Koenig *et al.*, 1987; Hoffman *et al.*, 1987) parvenait à identifier le gène DMD, en y découvrant la présence de défauts majeurs (délétions), puis à en analyser la structure normale et le pouvoir codant.

Le gène DMD et sa protéine, la dystrophine (Ahn & Kunkel, 1993; Hoffman, 2001)

Le gène DMD est l'un des tous premiers gènes de maladie identifiés par clonage positionnel. Il est morcelé en 79 petits exons (taille moyenne une centaine de paires de bases) disséminés sur un territoire génomique d'un peu plus de 2,1 millions de paires de bases, ce qui en fait de très loin le plus grand gène humain (environ la moitié du génome de la bactérie *E. coli*). L'immensité du territoire génomique occupé est dû à la taille extraordinaire des introns dont certains peuvent dépasser 200 kb. À ce gène correspond une grande variété de transcrits (promoteurs multiples, épissages alternatifs complexes), dont l'espèce principale exprimée dans le muscle est un ARN messager de 14 kb, traduit en une longue protéine, la dystrophine, de poids moléculaire élevé (427 kDa). La dystrophine est située sous la membrane sarcolemmique, comme le montrent les images d'immunodétection sur coupes transversales de muscle. Elle s'accroche par son extrémité C-terminale à la β -dystroglycane, protéine transmembranaire attachée du côté externe à la laminine et par delà aux autres protéines de la matrice extracellulaire; par son extrémité N-terminale elle s'accroche au réseau d'actine du cytosquelette intracellulaire.

La pathologie du gène, très variée, consiste en :

- grosses lésions : délétion ou duplication, affectant un ou plusieurs exons, et trouvées dans 70 % des cas ;
- petites lésions : délétion ou insertion d'une ou plusieurs paires de bases, substitutions, affectant moins d'un exon ou une région adjacente impliquée dans l'épissage.

Ces lésions ont des conséquences variables selon qu'elles permettent ou non la production d'un transcrit viable et la fabrication d'une dystrophine plus ou moins fonctionnelle. On peut distinguer : *i*) les mutations nulles : toutes lésions perturbant le cadre de lecture (délétions, insertions, mutations perturbant l'épissage), sub-

stitutions créant un non-sens direct ; *ii*) les mutations non-nulles : toutes lésions ne perturbant pas le cadre de lecture (délétions ou duplications en phase, faux-sens à vrai dire exceptionnels).

Les corrélations avec le tableau clinique ont fourni une explication moléculaire de la dualité DMD/BMD : les mutations nulles, empêchant toute production de dystrophine, produisent un tableau de DMD ; les autres un tableau de BMD. Cette explication est en première analyse conforme à la règle de Monaco qui veut que toute mutation respectant la phase entraîne un tableau de BMD, elle est aussi conforme aux observations de Hoffmann selon lesquelles la dystrophine est *i*) totalement absente ou effondrée (< 5 %) en cas de DMD ; *ii*) présente mais diminuée en quantité et parfois en poids moléculaire en cas de BMD.

Du gène à la maladie

À la lumière des critères ci-dessus définis il est devenu possible d'asseoir le diagnostic sur des bases moléculaires. Outre l'application évidente au diagnostic prénatal et à celui des femmes transmettrices, que nous envisagerons plus loin, la découverte de la sémiologie moléculaire de la dystrophine musculaire et de son gène a eu des répercussions considérables dans de nombreux domaines. On peut très schématiquement distinguer :

1) *l'impact nosologique* : en plus des tableaux classiques de DMD ou de BMD, ou des formes intermédiaires, il existe des présentations cliniques distinctes, jusque là totalement insoupçonnées :

- des formes à début très tardif. Le record est celui d'un sujet ayant eu les premières manifestations après 60 ans, et dont la dystrophine était amputée de 46 % de sa longueur dans sa partie centrale par une délétion en phase des exons 17 à 48. Ce cas a démontré que la dystrophine, protéine modulaire avec un domaine central fait de cassettes répétées, peut supporter l'amputation d'un certain nombre d'entre elles, si la phase est respectée. Il a permis de définir pour la première fois la notion de « minidystrophine »³, c'est à dire de dystrophine très raccourcie, mais encore plus ou moins fonctionnelle, et capable de « tenir » dans un vecteur de thérapie génique ;
- des formes pseudo-métaboliques avec crampes, myalgies, et myolyse d'effort ;
- des formes à début très précoce, voire congénitales ;
- des formes minimales se limitant à une intolérance à l'effort avec CPK élevée ;
- des formes avec manifestations cardiaques, à type de cardiomyopathie dilatée prédominante ou exclusive de toute atteinte squelettique patente.

Toutes ces formes cliniques sont bien éloignées des descriptions de Duchenne ou de Becker, mais elles correspondent à des mutations dans le même gène entraînant des anomalies de la dystrophine, d'où le vocable commun de « dystrophinopathie ».

2) *l'impact scientifique*: la découverte de la dystrophine a servi de fil d'Ariane ayant conduit à la découverte de protéines apparentées et de protéines associées (Love *et al.*, 1993 ; Tinsley *et al.*, 1993). Parmi les membres de la « famille dystrophine », très ressemblants mais codés par des gènes différents, citons l'utrophine (chromosome 6), la dystrobrevine (chromosome 18). Les homologies de structure nous renseignent non seulement sur la filiation phylogénétique de ces gènes, mais fournissent aussi des pistes fonctionnelles. L'utrophine, dont la séquence peptidique est homologue à 85 % avec celle de la dystrophine, ne s'exprime normalement qu'au niveau des jonctions neuromusculaires et myotendineuses et pas au niveau de la membrane des cellules musculaires normales. Elle y apparaît cependant dans les muscles déficients en dystrophine, mais en quantité insuffisante pour exercer une fonction de suppléance. Chez les souris dystrophinopathes une surexpression importante d'utrophine a été obtenue par transgénèse ; elle améliore considérablement les animaux (travaux de Kay Davies, 1997), d'où les espoirs mis dans la recherche de molécules naturelles ou synthétiques susceptibles de stimuler une forte réexpression d'utrophine dans la membrane musculaire.

Une cascade de protéines associées à la dystrophine a été reconstituée définissant une véritable « *Dystrophin connection* ». Parmi les premiers partenaires identifiés figurent les protéines du complexe membranaire des « *DAP* » (*Dystrophin Associated Proteins*), comportant les quatre sarcoglycanes⁴ (travaux poursuivis indépendamment par Kevin Campbell aux USA et Eijiro Ozawa au Japon), les dystroglycanes, les syntrophines. Leur mise à jour a permis d'identifier en 1994 (au locus LGMD2D) le premier gène de dystrophie musculaire à transmission autosomique récessive, celui de « l'adhaline », protéine ensuite rebaptisée α -sarcoglycane. Cette découverte inaugurerait la série des sarcoglycanopathies, qui forment une partie importante des myopathies des ceintures (LGMD2C, LGMD2D, LGMD2E, LGMD2F). L'identification de ces nouveaux gènes et protéines a eu une importance considérable, car leurs mutations entraînent un tableau de dystrophie musculaire progressive assez voisin de celui des dystrophinopathies. Il était dès lors tentant d'imaginer une physiopathologie commune. Celle-ci n'a cependant pas encore été éclaircie, puisque la réexpression des sarcoglycanes dans le sarcolemme de souris dystrophinopathes ne suffit pas à empêcher le processus dystrophique.

3) *l'impact diagnostique* :

Plusieurs volets sont à considérer selon que l'analyse porte (i) sur un malade, (ii) sur une femme à risque d'être transmettrice ; (iii) sur un fœtus à risque, c'est à dire dans un contexte de diagnostic prénatal

– *i*) le diagnostic positif et différentiel : il concerne un malade de sexe masculin, où le diagnostic de dystrophinopathie est suspecté sur des critères cliniques. Ici l'analyse moléculaire est indispensable, car on sait maintenant

³ Il est maintenant question de « microdystrophine ».

⁴ Auquel s'ajoute le sarcospan, et depuis peu une autre sarcoglycane (ζ).

que d'autres étiologies peuvent être à l'origine de dystrophies musculaires progressives. De telles «phénomènes» sont réalisées par exemple par des mutations touchant l'un des 14 gènes impliqués dans le déterminisme primaire des myopathies des ceintures (α -, β -, γ -, ou δ -sarcoglycanes, calpaïne, dysferline, fukutin-related protein...). Le recours à l'analyse moléculaire a conduit à bien des révisions diagnostiques. Nous ne comptons plus les cas de garçons étiquetés «Becker» ou de filles étiquetées «Duchenne-filles» qui étaient en fait des sarcoglycanopathies (le plus souvent α). La connaissance du gène défectueux et l'identification de la mutation sont devenues des impératifs absolus. En matière de dystrophinopathie, l'analyse génotypique directe est rendue délicate par la longueur du gène, le grand nombre d'exons, la variété des mutations. Ces contraintes imposent, avant d'entreprendre une analyse du gène qui peut être longue et coûteuse, de s'assurer qu'il s'agit bien d'une dystrophinopathie par l'analyse de la dystrophine musculaire (immuno-histochimie et western-blot). Cette stratégie diagnostique est hélas loin d'être toujours appliquée, car la biopsie musculaire est encore souvent jugée trop invasive. En fait on ne peut pas faire l'économie de celle-ci, puisqu'elle permet d'exclure d'emblée les autres dystrophies musculaires et dans ce cas de fournir une autre piste (l'analyse de la biopsie comporte toujours l'exploration de plusieurs protéines), d'inclure les formes atypiques citées plus haut, enfin, en cas de dystrophinopathie confirmée, d'indiquer s'il s'agit d'un Duchenne ou d'un Becker.

• *Analyse de la dystrophine sur biopsie*

Sur la biopsie musculaire, les coupes colorées par les réactifs classiques montrent les signes caractéristiques, mais non pathognomoniques, de dystrophie musculaire plus ou moins prononcée. La coloration spécifique de la dystrophine (il existe une batterie d'anticorps spécifiques de différents segments de la protéine) montre soit une absence totale de marquage au sarcolemme (DMD), soit un marquage diminué et irrégulier (BMD). Presque constamment, on note un déficit secondaire des protéines du complexe des *DAP*, en particulier de l' α -sarcoglycane. L'analyse par Western-blot, complément indispensable, est très précieuse pour l'évaluation quantitative et qualitative (poids moléculaire) des protéines musculaires (Nicholson *et al.*, 1993). On observe soit une absence totale de dystrophine (DMD), soit une diminution de sa quantité, avec parfois un poids moléculaire anormal (BMD), diminué en cas de délétion, augmenté en cas de duplication. Simultanément on explore un certain nombre de protéines musculaires grâce à une batterie d'anticorps mélangés à celui que l'on a choisi pour analyser la dystrophine (Western-blot multiplex).

Une fois le diagnostic de dystrophinopathie établi par l'exploration spécifique de la dystrophine, il est impératif de rechercher la mutation causale pour pouvoir répondre à toute demande de conseil génétique (autres membres de la famille, diagnostic prénatal).

• *Caractérisation de la mutation*

Chaque malade, ou chaque famille pour les cas familiaux, a sa mutation «privée», même si certains défauts

sont récurrents et retrouvés à l'identique dans des familles non apparentées. On doit schématiquement distinguer les cas «faciles» qui concernent les délétions ou duplications portant sur au moins un exon ou plus. Ceux-ci représentent environ deux tiers des cas. L'exploration est réalisée par PCR-multiplex permettant d'amplifier simultanément plusieurs exons, et de visualiser directement l'anomalie. Jusqu'à récemment on se contentait d'explorer 18 des exons sur les 79, car ils sont de très loin les plus fréquemment touchés. Dans les cas où cette exploration est restée négative (un tiers des cas) il faut explorer les autres exons et les «petites» mutations, lesquelles peuvent enlever ou ajouter un ou plusieurs nucléotides à l'intérieur ou à proximité de l'exon, ou encore substituer un nucléotide par un autre. La mise en évidence de ces mutations pose de délicats problèmes techniques et logistiques. En effet il n'est pas question de séquencer systématiquement chacun des 79 exons et ses régions avoisinantes qui contiennent les signaux d'épissage. La difficulté peut être contournée en analysant la séquence de l'ARN messenger, préalablement transformé en ADN complémentaire ou cDNA, qui est un concentré des séquences codantes, soit environ 11 000 nucléotides. Cette méthode exige d'avoir un échantillon de biopsie musculaire, car l'ARN messenger de la dystrophine musculaire pleine longueur est essentiellement présent dans le muscle. Pour éviter d'analyser toute la séquence codante, on peut essayer des raccourcis, consistant soit à ne rechercher que les mutations non-sens par une méthode spécifique (dite PTT), soit à cibler l'analyse sur une région particulière, notamment dans la partie distale du gène s'il existe d'importants troubles cognitifs. Seuls quelques centres très spécialisés sont en mesure d'offrir une exploration complète du gène à la recherche des petites mutations. Dans une proportion importante de cas, pouvant atteindre 30 % des malades, la mutation n'est pas encore systématiquement recherchée. Dans ces cas, si un conseil génétique doit être fourni, force est de se fier à l'analyse indirecte. Celle-ci est fondée sur l'analyse par une batterie de marqueurs intra- et juxtagéniques permettant de caractériser chaque chromosome X par son *haplotype*, et d'en suivre la ségrégation dans la famille pour identifier le chromosome portant la mutation. Cette méthode, qui n'est pas applicable si la famille est non informative, comporte un risque de recombinaison⁵, et en cas de mutation *de novo* il existe un risque important (10 à 20%) de mosaïcisme germlinal chez la mère⁶.

On s'efforce à l'heure actuelle de rechercher les mutations de tous types dans le gène DMD, non seulement pour augmenter la fiabilité du conseil génétique, mais aussi pour se tenir prêt à appliquer les thérapies spé-

⁵ Une recombinaison peut fausser le résultat si elle intervient entre le marqueur et le site de la mutation pathogène.

⁶ Lorsqu'une mutation *de novo* se produit dans la lignée germinale d'une femme elle n'affecte qu'une fraction variable de ses gamètes. Cette constitution en mosaïque, indétectable dans son ADN somatique, comporte le risque de transmission récurrente de la myopathie.

cifiques d'allèles. Pour répondre à la demande il faut des appareils sophistiqués, des réactifs coûteux, du personnel compétent⁷. De nombreux travaux portent sur la mise au point de méthodes rapides, fiables et peu coûteuses de « balayage » du gène DMD⁸. *A priori* la technologie des « puces » devrait répondre à la question, mais elle n'est pas encore au point, sans doute parce que le marché est trop restreint pour les fabricants. En attendant, avec l'aide de l'AFM, nous avons mis au point une stratégie assez simple et rapide qui consiste à détecter en un temps, sur l'ensemble des exons et de leurs régions adjacentes, n'importe quel type de mutation, grande ou petite, à l'exception des substitutions. Celles-ci ne sont ensuite recherchées, par analyse du cDNA, que dans les cas négatifs (environ 20 % des cas).

Dans la pratique courante nous sommes encore trop souvent requis d'effectuer un diagnostic positif ou différentiel en analysant d'emblée le gène alors qu'aucune biopsie n'est venue étayer le diagnostic de dystrophinopathie. Dans ces cas l'étape de balayage de tous les exons mentionnée ci-dessus rend d'éminents services, mais ces exclusions sont obtenues à un prix élevé. En fait l'exclusion à 100 % par l'analyse du gène est illusoire, car il existe de rares lésions qui échappent à l'exploration standard parce qu'elle siègent dans des régions non couvertes.

ii) le diagnostic des femmes transmettrices

Lorsqu'un diagnostic de dystrophinopathie a été porté chez un malade (cas index), l'examen de l'arbre généalogique montre quelles sont les femmes à risque, non pas de développer la maladie, mais de la transmettre ; il s'agit de la mère, des sœurs, des tantes et cousines maternelles. Si le taux de CPK sérique est franchement élevé le statut de transmettrice ne fait aucun doute. S'il est normal on ne peut rien conclure, et il faut recourir à une analyse du gène DMD. Si la mutation a été trouvée chez le propositus il suffit de la rechercher chez la femme à risque. Cette recherche était jusqu'à présent délicate, en raison de la présence du second chromosome X. Cette difficulté technique est à présent surmontée par les méthodes en vigueur.

Si la mutation du propositus n'est pas connue, pour quelque raison que ce soit, force est de recourir au diagnostic indirect, qui ne peut fournir qu'une probabilité.

iii) le diagnostic prénatal (DPN)

Idéalement il ne devrait être effectué que si la dystrophine a été analysée chez le cas index et la mutation identifiée, et seulement chez des femmes dont le statut de transmettrice a été préalablement établi. En pratique ces prérequis ne sont pas toujours respectés. Le DPN est

effectué sur de l'ADN de foetus masculin, extrait de villosités chorales vers la 10^{ème} semaine ou plus tard sur amniocytes cultivés. On y recherche la mutation déjà trouvée chez le cas index. Si elle est inconnue et que le cas index ne peut être analysé on doit recourir soit à un balayage de toutes les régions explorables du gène, et ceci dans un contexte d'urgence, soit au diagnostic indirect. Les cas les plus difficiles sont ceux où le diagnostic de dystrophinopathie n'est ni vérifié, ni vérifiable chez le cas index. Ils ne peuvent être résolus que par l'examen de la dystrophine musculaire, soit sur produit d'avortement (si la dystrophine est normale on peut identifier le « bon » chromosome X par l'analyse de l'haplotype dans la région du gène DMD, en vue d'une grossesse ultérieure avec DPN), soit sur une biopsie musculaire tardive effectuée sur un foetus viable (32^{ème} semaine).

Les problèmes en suspens

La physio-pathologie

Le rôle exact de la dystrophine normale et la pathogenèse de ses anomalies ne sont toujours pas éclaircis. L'hypothèse la plus ancienne et la plus vraisemblable est que la dystrophine jouerait un rôle de lien mécanique entre la matrice extra-cellulaire et le réseau cytosquelettique. Son défaut fragiliserait la membrane sarcolemmique, qui serait endommagée à chaque contraction musculaire. A cette hypothèse assimilant les maladies de la dystrophine à des « structuropathies », on ajoute aujourd'hui celle d'une dysfonction dans la transmission du signal (« signalopathie »). Les recherches visant à disséquer les mécanismes cellulaires et moléculaires de la dystrophie musculaire sont hautement prioritaires. Il faudrait comprendre pourquoi la destruction musculaire est progressive (la souffrance musculaire est déjà présente à la naissance, et même *in utero*, mais sans manifestation autre qu'une élévation de la CPK), pourquoi elle s'accompagne d'une fibrose intense, pourquoi la régénération musculaire, active et efficace au début, s'épuise progressivement, pourquoi certains territoires sont préférentiellement touchés (les muscles des racines des membres), et d'autres peu (le muscle cardiaque est tardivement atteint alors qu'il travaille en permanence) ou pas du tout (muscles oculo-moteurs). Pour élucider ces mécanismes on dispose de différents moyens, notamment :

i) l'analyse des perturbations moléculaires associées, pour identifier les gènes secondairement stimulés ou réprimés. Il faut débrouiller l'écheveau des interactions par l'analyse du *transcriptome* et du *protéome* musculaire. Les outils expérimentaux existent, et le catalogue des gènes (environ 30 000) et des protéines (plus de 200 000)⁹ est en cours d'établissement grâce au séquençage du génome humain qui est maintenant achevé. En comparant la situation observée dans les dystrophinopathies et dans les autres maladies muscu-

⁷ En France, le Ministère de la Santé a accepté le principe d'un financement d'un réseau national de laboratoires experts dans le domaine des maladies neuro-musculaires, ceci sur l'initiative de l'ANPGM (Association Nationale des Praticiens de Génétique Moléculaire) et avec l'appui décisif de l'AFM.

⁸ Il est très important de distinguer le « balayage » (scanning) où l'on recherche n'importe quelle mutation, du « criblage » (screening) qui consiste à rechercher des mutations prédéfinies.

⁹ Un même gène peut produire plusieurs isoformes protéiques.

lares (dystrophies progressives et myopathies non évolutives) on devrait parvenir à établir des corrélations entre les phénomènes pathologiques et les dérèglements moléculaires. Dans cette approche les modèles animaux, qu'ils soient spontanés (souris *mdx*, chiens *GRMD* et *LRMD*) ou induits expérimentalement par invalidation de gène (*knock-out*), par création de mutation spécifique (*knock-in*), et maintenant par extinction spécifique d'ARN messagers (*RNAi*), sont des auxiliaires extrêmement précieux (Allamand *et al.*, 2000). L'analyse de l'extinction de gène dans des modèles d'invertébrés (insectes, vers) est une approche nouvelle dont on attend beaucoup¹⁰.

ii) Les corrélations génotype → phénotype sont aussi un thème central. Il s'agit de trouver l'explication moléculaire des variations pathotypiques. En fait on sait maintenant qu'à une même mutation ne correspond pas obligatoirement un pathotype stéréotypé. Les explications simples trouvées dès le début (*pas de dystrophine* = DMD; *un peu de dystrophine* = BMD; *mutation hors-phase* = DMD et *mutation en-phase* = BMD) ne sont en fait pas toujours vérifiées. Dans ces exceptions il doit intervenir d'autres facteurs liés au terrain génétique. Chaque malade a dans son génome un assortiment unique de gènes variants, dont certains, non pathogènes en eux-mêmes, sont susceptibles, seuls ou en association, de moduler l'expression de la maladie. L'identification de ces gènes modulateurs, ainsi que des mécanismes liés à l'environnement extra-génétique est une tâche difficile, même s'il existe des pistes vraisemblables. Parmi celles-ci figurent :

- l'épissage alternatif qui peut faire sauter un ou plusieurs exons et ainsi rétablir le cadre de lecture en cas de délétion hors-phase ou bien en cas de mutation nonsense (ce dernier mécanisme a été démontré dans les cellules « révertantes » du muscle de la souris *mdx*). À cet égard on peut très bien concevoir que chez deux frères atteints de la même délétion hors-phase, l'un soit DMD et l'autre BMD si ce dernier a la chance d'avoir un profil d'épissage différent favorisant un saut d'exon correcteur ;

- les gènes appartenant à la panoplie des gènes impliqués dans la myogenèse (*MyoD*, *myogénine*, *myf5*, *myf6*), qui pourraient moduler les capacités de régénération.

Pour élucider les bases moléculaires de la variabilité des pathotypes pour un même génotype il convient de disposer de bases de données spécifiques de chaque gène de maladie, comportant toutes les informations biologiques et cliniques. Une telle base pour les dystrophinopathies (BMD/DMD) est en cours de construction à l'hôpital Cochin, avec près d'un millier de dossiers. Une

fois prête elle sera accessible sur internet et sera enrichie de l'expérience des autres centres spécialisés dans les maladies de la dystrophine.

Le traitement

En 2003, soit 15 ans après la découverte du gène DMD, force est de constater qu'il n'existe toujours pas de traitement étiologique, c'est à dire s'attaquant à la cause première de la maladie, le déficit en dystrophine. La thérapie génique, a d'abord été considérée comme la voie royale, voire unique. Elle n'a pas encore tenu ses promesses¹¹. De plus les myopathies ne constituent pas *a priori* un cas de figure favorable pour le transfert de gène, puisqu'il s'agit d'obtenir une expression d'une protéine de structure dans un très grand nombre de muscles, notamment vitaux comme les muscles respiratoires et le cœur. Le ciblage généralisé est un obstacle majeur, qui l'emporte sur tous les autres. C'est pourquoi au concept étroit de thérapie génique on substitue à présent celui de « *gene-based therapy* » c'est-à-dire d'actes thérapeutiques fondés sur la connaissance des gènes¹². Heureusement, il existe d'autres approches alternatives émergentes. Elles sont porteuses d'espoir, notamment la thérapie cellulaire à l'aide de cellules souches somatiques autologues corrigées *ex vivo*. Cette ouverture est très récente, et il n'y a pas encore de preuves expérimentales publiées. Elle devrait grandement bénéficier de l'expérience acquise dans le domaine de la thérapie génique classique, notamment en ce qui concerne la vectorologie.

Enfin, la *pharmacogénomique* devrait permettre d'identifier des cibles intéressantes pharmacomanipulables, par exemple pour stimuler un gène vicariant (utrophine) ou agir sur des gènes impliqués dans la réponse dystrophique.

Conclusion

En faisant émerger le concept de dystrophinopathie, l'approche moléculaire de la myopathie de Duchenne et de ses formes cliniques a bouleversé la nosologie classique fondée sur des critères anatomo-cliniques. Elle a permis d'offrir aux familles un conseil génétique objectif et fiable. En revanche les bénéfices thérapeutiques se font cruellement attendre. Ceci n'est pas étonnant car l'objectif est ici autrement plus complexe que celui qui consistait, pendant les 20 dernières années, à traquer et identifier les gènes de maladie. Tous les efforts de l'ère « post-génomique » qui s'ouvre visent à exploiter les connaissances acquises pour en déduire des conduites thérapeutiques raisonnées.

¹¹ Cette situation n'est pas propre aux maladies musculaires, car le seul succès en matière de maladie génétique est la guérison d'enfants atteints de déficit immunitaire combiné (SCID), obtenu par transfert *ex vivo* du gène correcteur dans des lymphocytes, ce qui leur confère un avantage sélectif permettant une repopulation *in vivo* (équipe d'Alain Fischer, 2000).

¹² Le terme de « *généthérapie* » récemment proposé risque d'être confondu par le profane avec celui de thérapie génique.

¹⁰ Le ver *Caenorhabditis elegans*, qui ne possède que 900 cellules au total, dont 98 de type musculaire, est un modèle très séduisant par sa simplicité. Des mutations expérimentales de la dystrophine induisent des pathotypes manipulables par des agents pharmacodynamiques (travaux de l'équipe de Laurent Ségalat, ENS, Lyon).

BIBLIOGRAPHIE

- Ahn A. H. & Kunkel L. M., The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat. Genet.*, 1993, 3, 283-291.
- Allamand V. & Campbell K. P., Animal models for muscular dystrophy: valuable tools for the development of therapies. *Hum. Mol. Genet.*, 2000, 9, 2459-2467.
- Botstein D., White R. L., Skolnick M. & Davis R. W., Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 1980, 32, 314-331.
- Davies K. E., Challenges in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.*, 1997, 7, 482-486.
- Hoffman E. P., Brown R. H. Jr. & Kunkel L. M., Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 1987, 51, 919-928.
- Hoffman E. P., "Dystrophinopathies". In : Karpati G., Hilton-Jones D., Griggs R. C., *Disorders of Voluntary Muscle*, 7th ed., 2001, Chap. 19, pp. 385-432.
- Kingston H. M., Sarfarazi M., Thomas N. S. & Harper P. S., Localisation of the Becker muscular dystrophy gene on the short arm of the X chromosome by linkage to cloned DNA sequences. *Hum. Genet.*, 1984, 67, 6-17.
- Koenig M., Hoffman E. P., Bertelson C. J., Monaco A. P., Feener C. & Kunkel L. M., Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, 1987, 50, 509-517.
- Love D. R., Byth B. C., Tinsley J. M., Blake D. J. & Davies K. E., Dystrophin and dystrophin-related proteins: a review of protein and RNA studies. *Neuromuscul. Disord.*, 1993, 3, 5-21.
- Monaco A. P., Bertelson C. J., Liechti-Gallati S., Moser H. & Kunkel L. M., An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics*, 1988, 2, 90-95.
- Monaco A. P., Neve R. L., Colletti-Feener C., Bertelson C. J., Kurnit D. M. & Kunkel L. M., Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature*, 1986, 323, 646-650.
- Murray J. M., Davies K. E., Harper P. S., Meredith L., Mueller C. R. & Williamson R., Linkage relationship of a cloned DNA sequence on the short arm of the X chromosome to Duchenne muscular dystrophy. *Nature*, 1982, 300, 69-71.
- Nicholson L. V., Johnson M. A., Bushby K. M., Gardner-Medwin D., Curtis A., Ginjaar I. B., den Dunnen J. T., Welch J. L., Butler T. J., Bakker E. & *et al.*, Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical, and histopathological data. Part 2. Correlations within individual patients. *J. Med. Genet.*, 1993, 30, 737-744.
- Tinsley J. M., Blake D. J., Pearce M., Knight A. E., Kendrick-Jones J. & Davies K. E., Dystrophin and related proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1993, 3, 484-490.