

Traitement pharmacologique des myopathies de Duchenne et de Becker

par Vincent Voisin & Sabine de la Porte

Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, CNRS UPR 9040, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif sur Yvette cedex, France.

Correspondance : Sabine de la Porte. Tél. : 01 69 82 36 27. Télécopie : 01 69 82 41 41.

E-mail : sporte@nbcn.cnrs-gif.fr

Reçu le 17 mars 2004

RÉSUMÉ

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique sévère liée au chromosome X qui touche 1 garçon sur 3 500. Cette pathologie est due à l'absence d'une protéine du cytosquelette située sous le sarcolemme, la dystrophine, entraînant une dégénérescence progressive des tissus musculaires (lisses, squelettiques et cardiaque). Une forme moins sévère de la maladie, la dystrophie musculaire de Becker (DMB), se caractérise par la présence d'une dystrophine tronquée semi-fonctionnelle ou de la forme entière de la dystrophine en quantité réduite. Trois grandes classes de thérapie sont à l'étude actuelle-

ment : la thérapie génique, la thérapie cellulaire et la thérapie pharmacologique. L'une des stratégies retenues consiste à surexprimer l'utrophine, une protéine homologue à plus de 80 % avec la dystrophine, puisque l'utrophine est capable d'assurer les fonctions cellulaires de la dystrophine. Dans cette revue, nous présenterons les études de thérapie pharmacologique. On peut distinguer trois approches : celle qui vise à améliorer le phénotype dystrophique, celle qui vise à réexprimer la dystrophine ou celle qui vise à surexprimer l'utrophine.

SUMMARY Pharmacological treatments for Duchenne and Becker dystrophies

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a severe X-linked genetic disease affecting 1 boy out of 3,500. DMD is due to the lack of a submembranous cytoskeletal protein named dystrophin, leading to the progressive degeneration of skeletal, cardiac and smooth muscle tissue. A milder form of the disease, Becker muscular dystrophy (BMD), is characterised by the presence of a semi-functional truncated dystrophin, or the full-length dystrophin at reduced level. Three different therapeutic approaches are currently under

study, gene therapy, cellular therapy and pharmacological therapy. One of the chosen strategies consists of the overexpression of utrophin, a protein 80 % homologous with dystrophin, and able to perform similar functions. In this review, we shall consider studies of pharmacological therapy, the aims of which can be classified in three categories: reversal of dystrophic phenotype, dystrophin expression, utrophin overexpression.

DONNÉES CLINIQUES ET PHYSIOPATHOLOGIQUES

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des maladies génétiques, affectant 1 garçon sur 3 500 et touchant l'ensemble des muscles (squelettiques, lisses et cardiaque). Les premiers signes cliniques surviennent au moment de l'acquisition de la marche, et deviennent évidents vers l'âge de 5-6 ans. C'est généralement vers 8-9 ans que le recours occasionnel à un fauteuil roulant est nécessaire, et la perte

définitive de la marche survient généralement vers 10-12 ans. La faiblesse des muscles intercostaux entraîne également une diminution progressive de la capacité respiratoire ainsi qu'une tendance accrue aux infections pulmonaires. Cette insuffisance respiratoire survient dès l'âge de 14 ans et s'aggrave avec le développement de la maladie, entraînant le décès vers l'âge de 25-30 ans. Une atteinte cardiaque est également associée à l'atteinte respiratoire. Il s'agit d'une cardiomyopathie qui débute dès l'âge de 5 ans, et qui évolue parallèlement avec l'aggravation de la maladie. Cependant, cette atteinte

cardiaque ne serait responsable que de 20 % des décès (Finsterer & Stollberger, 2003).

En 1955, Becker et Kiener ont décrit une autre forme de dystrophie musculaire progressive dont la transmission est également liée au sexe. Contrairement à la DMD, la dystrophie musculaire de Becker (DMB) présente de grandes variations phénotypiques. L'âge de début de la maladie se situe entre 2 et 20 ans (en moyenne vers 12 ans), et l'évolution de la maladie est beaucoup plus lente avec une incapacité de marcher vers 30 ans et le décès plus de 30 ans après l'apparition des premiers symptômes cliniques. Il existe des cas de DMB qui présentent des signes cliniques proche de ceux de la DMD et d'autres où les patients sont toujours capables de marcher à 60 ans (England *et al.*, 1990).

C'est par le premier succès mondial de la technique du clonage positionnel que le gène responsable de la pathologie a été localisé sur le bras court du chromosome X au niveau du locus Xp21, qui code la dystrophine (Davies *et al.*, 1983; Emanuel *et al.*, 1983; Monaco *et al.*, 1985). Dans un organisme, la dystrophine (Fig. 1) est localisée sous le sarcolemme de toutes les fibres (Bonilla *et al.*, 1988; Zubrzycka-Gaarn *et al.*, 1988), en interaction avec l'actine et avec un complexe protéique (Campbell & Kahl, 1989). Le rôle de la dystrophine n'a, à ce jour, jamais été clairement démontré mais l'hypothèse la plus vraisemblable serait celui d'un maintien de la stabilité membranaire au cours du stress lié aux cycles de contraction/relâchement répétés (Carpenter *et al.*, 1990). Cette protéine ne représente que 0,002 % des protéines musculaires totales, mais 5 % des protéines cytosquelettiques, ce qui explique le rôle majeur de la dystrophine au niveau structural (Ohlendieck & Campbell, 1991a). Chez l'homme, au cours du développement, l'expression de la dystrophine et sa localisation membranaire ont lieu à la 8^{ème} semaine de gestation dans les muscles lisses et cardiaque, alors que, dans les muscles squelettiques, la dystrophine est d'abord retrouvée dans le cytoplasme avant de s'accrocher à la membrane vers la 10^{ème} semaine de gestation (Chevron *et al.*, 1994). Chez l'adulte, la quantité de dystrophine est beaucoup plus importante dans les muscles squelettiques et le muscle cardiaque que dans les muscles lisses (Byers *et al.*, 1991). Chez un patient atteint de DMD ou de DMB, la dystrophine est absente du sarcolemme (DMD) où son expression est fortement réduite (DMB) (Bonilla *et al.*, 1988; Hoffman *et al.*, 1988; Zubrzycka-Gaarn *et al.*, 1988).

Ce sont des mutations au niveau du gène de la dystrophine qui sont la cause de la pathologie. Pour les deux-tiers des cas de DMB et de DMD, la mutation correspond à une large délétion dans le gène de la dystrophine, alors que pour le tiers restant, il s'agit de mutations ponctuelles ou de petites délétions (quelques cas de duplications d'un ou plusieurs exons ont également été rapportés) (Monaco *et al.*, 1985; Koenig *et al.*, 1987; Den Dunnen *et al.*, 1989). Dans la grande majorité des cas, les mutations ponctuelles introduisent dans la séquence génique un codon stop prématuré. Dans deux cas sur trois, la maladie est transmise par une mère porteuse d'un chromosome X muté pour le gène de la dys-

trophine et, dans un cas sur trois, il s'agit de mutations *de novo* lors de la formation des gamètes chez la mère.

Le complexe protéique associé à la dystrophine (Fig. 1) se compose de plusieurs protéines (Ervasti *et al.*, 1990; Yoshida & Ozawa, 1990) que l'on peut classer en trois groupes (Yoshida *et al.*, 1994) : le groupe des dystroglycanes, le groupe des sarcoglycanes et le groupe cytoplasmique. Ce complexe protéique est réduit de 80-90 % dans le muscle dystrophique, et disparaît de la membrane (Ohlendieck & Campbell, 1991b; Ohlendieck *et al.*, 1993; Mizuno *et al.*, 1994). Cependant, cette réduction n'est pas systématiquement accompagnée d'une réduction des taux d'ARN messagers codant les différentes protéines, c'est le cas par exemple pour la famille des dystroglycanes (Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.*, 1992). Dans le cas des patients atteints de la DMB, on observe simplement une réduction modérée de ce complexe, les formes de dystrophine permettent encore une association totale ou partielle avec le complexe protéique (Matsumura *et al.*, 1993; Matsumura *et al.*, 1994). L'absence de dystrophine a de nombreuses conséquences fonctionnelles et structurales sur le muscle. On peut citer des perturbations de la perméabilité membranaire, de la concentration calcique intra-cellulaire, de la force musculaire, des capacités de régénération musculaire et de nombreuses modifications histopathologiques (pour revue, voir Blake *et al.*, 2002).

De multiples voies thérapeutiques sont envisagées pour la DMD et la DMB. Certaines sont des thérapies palliatives (thérapies pharmacologiques), alors que d'autres sont des thérapies à visée curative (thérapies cellulaires et génotherapies) (voir Tableau I). Dans cet article, nous présentons les thérapies pharmacologiques qui ont pour but : 1) soit une amélioration phénotypique sans chercher à cibler la dystrophine ou l'utrophine; 2) soit une restauration de l'expression de la dystrophine; 3) soit un remplacement de la dystrophine par l'utrophine.

AMÉLIORATION DU PHÉNOTYPE DES MALADES

De nombreux essais cliniques (ou précliniques) ont été réalisés avec diverses molécules. Les résultats de ces études sont souvent très difficiles à interpréter, du fait de la combinaison de différentes thérapies sur les enfants participant à ces études. Cependant, plusieurs essais sont menés aujourd'hui avec quelques molécules qui semblent prometteuses.

Les corticostéroïdes

Les stéroïdes sont les médicaments qui ont été les plus étudiés, et sur lesquels la recherche dispose d'un nombre d'années de recul suffisant pour estimer les bénéfices (et inconvénients) du traitement. Le principal stéroïde utilisé est la prednisolone dont l'étude dans la DMD a débuté il y a près de 30 ans. Le traitement de cellules musculaires en culture par la prednisolone stimule la myogenèse (Sklar & Brown, 1991; Passaquin *et al.*, 1993). De plus, en condition de stress hypo-osmotique qui pro-

TABLEAU I.– Thérapie pharmacologique de la dystrophie de Duchenne.

Stratégie	Traitement	Système utilisé	Observations
Amélioration du phénotype	Corticostéroïdes	<i>mdx</i> et DMD	Amélioration de l'homéostasie calcique, augmentation de la myogenèse
	Créatine	<i>mdx</i>	Protection des muscles rapides contre la nécrose
	Carnitine	DMD	Restauration partielle de l'ATP, augmentation de la puissance musculaire
	Taurine IGF-1	<i>mdx</i> <i>mdx</i>	Amélioration du couplage excitation/contraction Diminution de la nécrose et de la fibrose, et augmentation de la force
	Myostatine	<i>mdx</i>	Diminution de la créatine kinase et de la dégénérescence, augmentation de la force
Réexpression de la dystrophine	Aminoglycosides Anti-sens Chiméroplastie	<i>mdx</i> et DMD <i>in vitro</i> et <i>mdx</i> <i>mdx</i> et GRMD	Ne concerne que les mutations non-sens Injection fréquente Faible efficacité de l'injection, ne concerne que les mutations ponctuelles
Surexpression de l'utrophine	Corticostéroïdes	<i>mdx</i> et DMD	Amélioration de l'homéostasie calcique, augmentation de la myogenèse
	Interleukine 6 Agrine	<i>mdx</i> <i>in vitro</i> et <i>mdx</i>	Résultat non observé chez la souris saine Augmentation du transcrit de l'utrophine mais absence de résultat <i>in vivo</i>
	Héréguline Calcineurine	<i>in vitro</i> et <i>mdx</i> <i>mdx</i>	Augmentation du transcrit de l'utrophine Amélioration du phénotype dystrophique. Molécule activatrice à déterminer
	Voie du NO	<i>mdx</i>	Augmentation de l'utrophine <i>in vivo</i> , nette amélioration phénotypique

voque une augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire analogue à celle que l'on observe dans les fibres musculaires DMD, la prednisolone prévient l'augmentation de la concentration calcique (Leijendekker *et al.*, 1996). Elle a le même effet sur des myotubes *mdx* (modèle murin de la DMD) (De la Porte *et al.*, 1999; Gillis, 1999) dont la concentration en Ca^{2+} intracellulaire est anormalement élevée. Les études effectuées chez l'homme montrent un effet bénéfique du traitement sur la force musculaire, mais aucun consensus n'a pu être établi sur le prolongement de la capacité de marcher des patients DMD ni sur leur mortalité. Le principal problème réside dans la diversité des doses employées selon les protocoles expérimentaux. Il apparaît cependant que l'injection quotidienne et de longue durée de 1 g/kg/jour est toxique (Muntoni *et al.*, 2002). Une étude récente propose un traitement à long terme des patients DMD par ce stéroïde à une dose de 0,75 mg/kg/jour de façon discontinue (10 jours/mois ou 10 jours avec une injection puis 10 jours de pause). Une amélioration de la force musculaire et de la marche, sans effet secondaire apparent a été observée (Muntoni *et al.*, 2002). De plus, il semble que ce stéroïde ait un effet optimal lors des premières phases cliniques de la maladie (Kinali *et al.*, 2002). Plusieurs théories sur le mécanisme d'action des stéroïdes sont proposées (augmentation de la myogenèse, diminution de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire) mais aucune étude au niveau cellulaire n'a été effectuée.

La créatine

L'ensemble de l'étude effectuée sur la créatine a été réalisé par l'équipe de U.T. Rüegg. Il a d'abord été mon-

tré *in vitro* sur un système de cellules en culture que la créatine permettait de réduire l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytoplasmique induite par un choc hypo-osmotique, ainsi que d'augmenter la myogenèse et la survie des myotubes (Pulido *et al.*, 1998). Par la suite, des études ont été réalisées *in vivo* sur des souris *mdx* nourries par une alimentation enrichie en créatine, qui ont présenté une protection de leurs muscles de type rapide (*EDL*) vis-à-vis de la nécrose, mais aucune amélioration statistiquement fiable n'a pu être mise en évidence pour les muscles de type lent (soléaire). Cependant, une restauration de la respiration mitochondriale à un niveau comparable à celui des souris saines a été observé sur les deux types de muscles (Passaquin *et al.*, 2002). Ces résultats seraient dus à une association de la créatine kinase avec la SERCA (Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique), et avec l'ATP/ADP translocase au niveau mitochondrial.

Par ailleurs, puisque les glucocorticoïdes induisent normalement une augmentation de la créatine musculaire, il est proposé de compléter le traitement par les stéroïdes avec de la créatine dans le but de diminuer les doses de corticoïdes et de réduire ainsi leurs effets toxiques (McIntosh *et al.*, 1998).

La carnitine

La L-carnitine est très concentrée dans le muscle (97 %) et assure le transport des acides gras à chaîne longue dans la mitochondrie, ce qui stimule la production énergétique. Un déficit en carnitine a été observé chez les enfants DMD présentant des signes cliniques précoces de la maladie (Berthillier *et al.*, 1982). Le trai-

tement des patients par la carnitine permet une restauration partielle du niveau d'ATP au niveau musculaire, une correction du métabolisme des purines et une augmentation significative de la force musculaire (Abdel Meguid *et al.*, 2000).

La taurine

La taurine est un acide aminé qui n'entre pas dans la composition des protéines. Dans le muscle, le niveau de taurine est particulièrement faible chez la souris *mdx* dans les phases de pré-dystrophie et les phases de dégénérescence active. Au contraire, le contenu en taurine des muscles augmente significativement dans les phases de régénération et de stabilisation de la maladie (McIntosh *et al.*, 1998). L'analyse de ces résultats a conduit le groupe de D. C. Camerino à tester l'effet de cet acide aminé chez la souris *mdx*. Un effet bénéfique de la taurine sur le couplage excitation/contraction a été décrit (De Luca *et al.*, 2001).

Les facteurs de croissance

Le principal facteur de croissance étudié est l'IGF-1 (Insulin like Growth Factor 1); ce facteur joue un rôle important dans la régénération musculaire, en stimulant la prolifération et la différenciation des cellules satellites (Engert *et al.*, 1996). L'expression de l'IGF-1 au niveau musculaire, sous la dépendance du promoteur des chaînes légères de myosine, chez une souris *mdx* transgénique (*mdx:Igf^{+/+}*), a pour conséquences une hypertrophie musculaire, une augmentation de la force musculaire, une diminution de la nécrose et de la fibrose (Barton *et al.*, 2002). Chez les animaux transgéniques, aucune toxicité de l'IGF-1 n'a été mise en évidence; dans une autre étude l'expression de l'IGF-1 présentait des effets nocifs au niveau du cœur, avec une augmentation de la fibrose et une diminution des performances systoliques (DeLaughter *et al.*, 1999). Cette différence serait due au niveau d'expression du gène de l'IGF-1 selon le promoteur utilisé. Il est important de noter que l'amélioration phénotypique est retrouvée dans l'ensemble des muscles, y compris le diaphragme, muscle particulièrement affecté chez la souris *mdx*. En effet, la force développée par le diaphragme d'une souris *mdx* après injection de l'IGF-1 est augmentée de 49 % et sa résistance à la fatigue de 30 % (Gregorevic *et al.*, 2002).

La myostatine

La myostatine est un membre de la famille du TGF- β (Transforming Growth Factor- β) qui régule négativement la myogenèse. La prolifération des myoblastes en culture (cellules C2C12) est diminuée par une application de myostatine qui empêche la transition de la phase G1 à la phase S au cours du cycle cellulaire (Thomas *et al.*, 2000). Ce blocage de la prolifération cellulaire par la myostatine est dû à une répression de facteurs myogéniques tels que Myf5, Myo D ou la myogénine (Langley *et al.*, 2002). La myostatine est abondante dans les fibres

nécrotiques et dans le tissu conjonctif des muscles DMD endommagés, alors que les fibres en régénération en contiennent peu (Kirk *et al.*, 2000). A l'inverse, une souris knock-out pour le gène de la myostatine présente une lipogenèse musculaire réduite, une augmentation de sa masse musculaire et de la force développée. Le croisement d'une souris *mdx* et d'une souris knock-out pour la myostatine a été réalisé, et le phénotype résultant se caractérise par une augmentation de la force des souris, avec moins de fibrose et un moindre remplacement du tissu musculaire par du tissu adipeux (Wagner *et al.*, 2002). Un essai pharmacologique a finalement été conduit par le groupe de Tejvir Khurana en bloquant la myostatine endogène par l'injection d'anticorps monoclonaux dirigés contre cette protéine. Ce traitement a permis, chez la souris *mdx*, de réduire le taux sanguin de créatine kinase (marqueur de la dégénérescence musculaire), d'augmenter la masse et la force musculaire ainsi que la masse totale de l'animal (Bogdanovich *et al.*, 2002).

RÉ-EXPRESSION DE LA DYSTROPHINE

Dans 15 % des cas, la DMD est due à une mutation ponctuelle dans la séquence nucléotidique du gène codant la dystrophine. Les stratégies thérapeutiques envisagées tentent 1) de forcer la lecture du codon stop en utilisant certaines molécules (aminoglycosides); 2) d'utiliser un ARN anti-sens pour sauter l'exon portant la mutation, ce qui permet l'expression d'une dystrophine tronquée, mais qui peut avoir un rôle fonctionnel, comme c'est le cas généralement dans la DMB; 3) de réparer l'exon muté (chiméraplastie). Enfin, sur un plan fondamental, ces stratégies thérapeutiques devraient être applicables à d'autres pathologies d'origine génétique.

Les aminoglycosides

Deux études indépendantes publiées en 1979 ont montré simultanément la possibilité de supprimer les mutations non-sens par les antibiotiques de la famille des aminoglycosides (hygromycine B, paromomycine, gentamicine...) chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Palmer *et al.*, 1979; Singh *et al.*, 1979). Ce n'est que 20 années plus tard que ce résultat a été exploité dans le cadre de la dystrophie musculaire de Duchenne, dans le but de restaurer la lecture totale du gène pour les malades ayant un codon stop prématuré sur le gène codant pour la dystrophine (10-15 % des patients). Le traitement de cultures de cellules musculaires de souris *mdx* (la souris *mdx* a un codon stop prématuré au niveau de l'exon 23 (Bulfield *et al.*, 1984)) par la gentamicine, a permis l'expression de la dystrophine et sa localisation au niveau membranaire. Cette étude comportait aussi un traitement *in vivo* des souris *mdx* par la gentamicine, qui a induit la ré-expression de la dystrophine sous le sarcolemme de la fibre (Barton-Davis *et al.*, 1999). Cependant, l'efficacité de ce traitement semble varier selon la nature du codon stop (UGA, UAG et UAA), le codon opale (UGA) étant

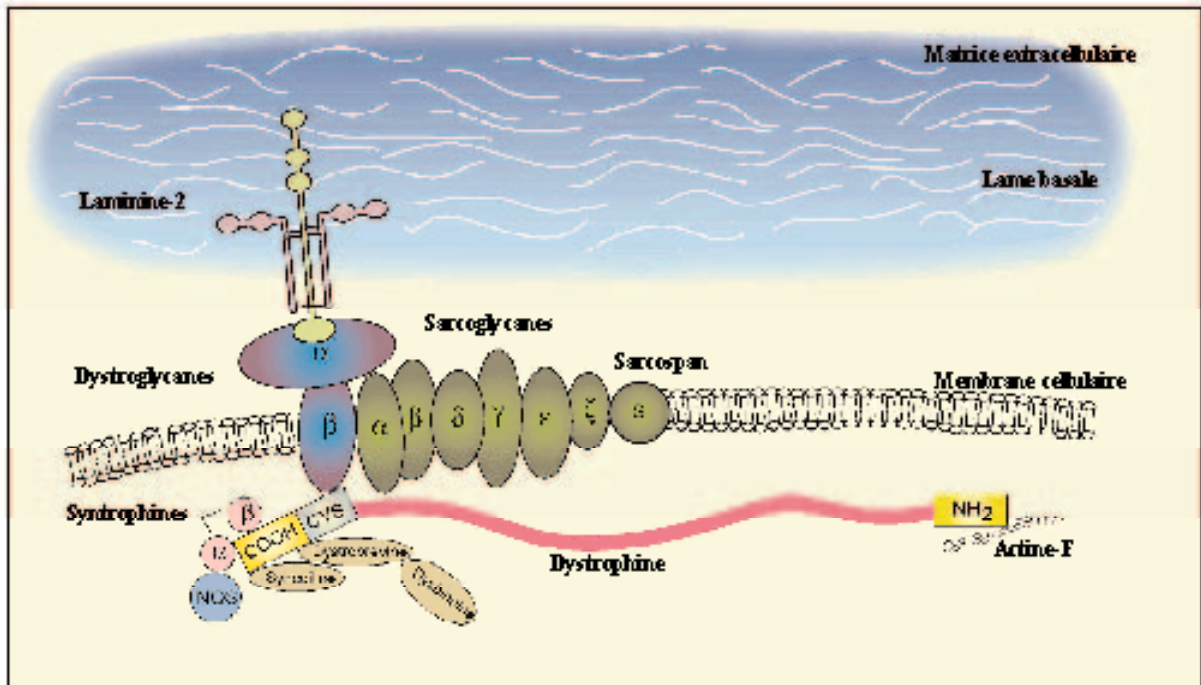


FIG. 1. – Organisation du complexe protéique associé à la dystrophine.

La dystrophine interagit avec des protéines extracellulaires (α -dystroglycane), transmembranaires (sarcoglycane-sarcospan, β -dystroglycane) et cytoplasmiques (syntrophines, dystrobrevine, syncoiline, dysbindine et actine) dans le muscle. Cys, région riche en cystéine; NOS, Nitric Oxide Synthase.

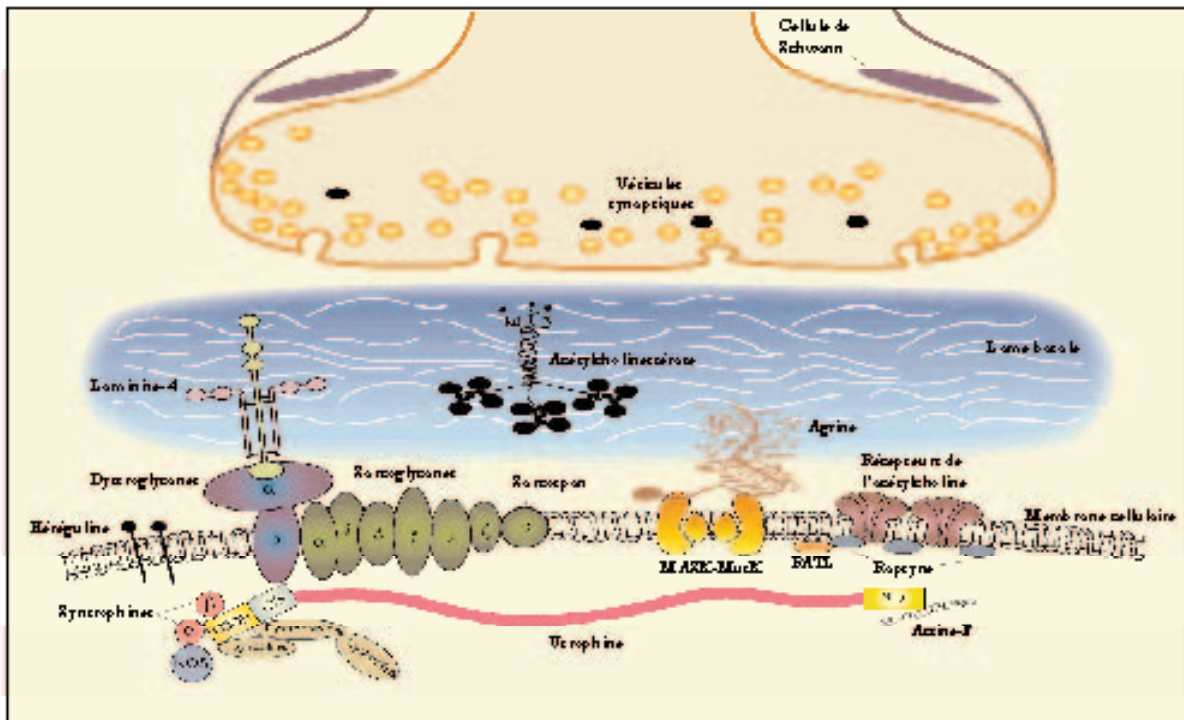


FIG. 2. – Organisation du complexe protéique à la jonction neuromusculaire (JNM).

Au niveau de la JNM, l'utrophine est associée à un complexe glycoprotéique similaire à celui qui est associé avec la dystrophine. S'y ajoutent des structures spécifiques de la JNM telles que l'agrine, le complexe MASC-MusK, les récepteurs à l'acétylcholine (AChR), la rapsyne chargée de recruter les AChR, et le récepteur à l'hérogiline (Erb B2/3). CYS, cystéine; NOS, Nitric Oxide Synthase; RATL, Rapsyn-Associated Transmembrane Linker; MASC, Muscle-Associated Specific Component; MusK, Muscle Specific Kinase.

préférentiellement supprimé par la gentamicine. De plus, il semble que la nature du nucléotide qui précède ce codon ait un impact significatif dans l'ordre suivant d'efficacité $C > U > A = G$ (Howard *et al.*, 2000). Sur la base de ces résultats, des essais ont été effectués chez l'homme par injection intra-veineuse de gentamicine (7,5 mg/kg/jour) pendant deux semaines. Les résultats se sont malheureusement révélés négatifs sur l'expression de la dystrophine (Wagner *et al.*, 2001). D'autres essais sont en cours avec des doses d'antibiotiques ou des durées de traitement variables. Pour le moment, les résultats restent contradictoires (Dunant *et al.*, 2003 ; Politano *et al.*, 2003).

La stratégie anti-sens

L'idée d'utiliser cette stratégie comme thérapie potentielle de la DMD vient de l'observation chez la souris *mdx* et chez les enfants DMD de quelques fibres musculaires exprimant la dystrophine (dites fibres révertantes). Deux hypothèses sont envisagées pour expliquer l'expression de la dystrophine dans des muscles théoriquement déficients en cette protéine. La première hypothèse est celle d'une nouvelle mutation qui a rétabli le cadre de lecture. La seconde hypothèse est un saut de l'exon qui porte la mutation (exon skipping) lors de la phase d'épissage, rétablissant le cadre de lecture mais conduisant à la synthèse d'une dystrophine tronquée qui peut être en partie fonctionnelle et conférer un phénotype proche de la DMB (Sherratt *et al.*, 1993 ; Wilton *et al.*, 1997 ; Lu *et al.*, 2000). C'est cette seconde hypothèse qui est explorée avec la stratégie anti-sens pour contrôler le saut d'exon normal, afin de rétablir chez le patient le cadre de lecture.

La stratégie anti-sens est basée sur l'utilisation de petites séquences d'ARN modifiées nommées AON (antisens oligoribonucléotides), qui sont choisies pour se lier spécifiquement à l'ARN. Les premières études se sont focalisées naturellement sur la souris *mdx* au niveau de l'exon 23 qui porte la mutation. Un oligoribonucléotide complémentaire du site d'épissage 3' de l'intron 22 de la dystrophine a été injecté dans des myoblastes primaires de souris *mdx*. L'analyse par RT-PCR du transcrit obtenu chez ces cellules montre un épissage qui s'étend de l'exon 22 jusqu'à l'exon 30, sautant l'exon muté 23, créant un nouveau transcrit tronqué de la dystrophine (Dunckley *et al.*, 1998). Ce résultat a également été obtenu sur des cultures primaires de patients DMD, avec une efficacité de 75 % environ (van Deutekom *et al.*, 2001 ; Aartsma-Rus *et al.*, 2003) et chez des souris *mdx* (Gebbski *et al.*, 2003). Aujourd'hui, cette stratégie est validée, et les recherches portent sur une amélioration de l'efficacité des AONs, basée sur une étude de leur affinité pour des ARN synthétiques (Dickson *et al.*, 2002 ; Mann *et al.*, 2002). La difficulté de cet axe de recherche, du point de vue de son application thérapeutique, est la nécessité de faire des injections périodiques au patient. Afin de pallier cet inconvénient, une étude qui se rapproche de la thérapie génique a montré la possibilité d'exprimer de manière stable *in vivo* des ARN chi-

mériques contenant la séquence anti-sens (De Angelis *et al.*, 2002).

La chiméraplastie

La chiméraplastie est une technique décrite en 1996 par E. Kmiec dans le cadre d'une maladie sanguine (Cole-Strauss *et al.*, 1996 ; Yoon *et al.*, 1996), et qui ne concerne que les mutations ponctuelles. La technique repose sur l'utilisation d'oligonucléotides ADN/ARN chimériques (nommés chiméraplastes) de manière à induire des mécanismes moléculaires de réparation de l'ADN. L'oligonucléotide choisi est homologue de la séquence du gène étudié, à l'exception d'une base qui correspond à la mutation ponctuelle que l'on souhaite supprimer. Ce mauvais alignement sur une base active les mécanismes endogènes de réparation, ce qui permet la substitution de la base désirée dans le gène ciblé. Ces résultats ont été repris principalement par Thomas A. Rando dans le but d'une application à la DMD, par un travail sur la souris *mdx*, au niveau du codon stop. L'injection du chiméraplaste dans les muscles de la souris *mdx* permet l'expression de dystrophine au niveau des points d'injection après deux semaines. L'injection au niveau du *Tibialis* ne permet de toucher que 1 à 2 % des fibres de l'ensemble de muscle, mais ce résultat est stable après les 10 semaines d'étude (Rando *et al.*, 2000). De plus, il semble que le chiméraplaste puisse également réparer l'exon concerné dans les cellules satellites, ce qui, du point de vue thérapeutique, est un élément important pour le renouvellement musculaire (Bertoni & Rando, 2002). Chez le chien, autre modèle d'étude de la DMD, le même type de résultat a été obtenu ; le groupe de Bartlett a réparé une mutation dans l'intron 6 qui conduisait à l'absence de l'exon 7 et à un décalage du cadre de lecture (Bartlett *et al.*, 2000).

Malgré le caractère prometteur des thérapies décrites ci-dessus, l'analyse des stratégies retenues fait ressortir deux problèmes principaux. Le premier, spécifique des thérapies indépendantes de la dystrophine, est l'absence d'un traitement global de la pathologie, chacun des composés n'ayant pour but de contrôler qu'un aspect spécifique du développement de la maladie. Le second, spécifique des thérapies pharmacologiques associées à la dystrophine, est l'impossibilité de généraliser les résultats obtenus à l'ensemble des patients dystrophiques. En effet, chacune des études ne concerne qu'un type de mutation particulier, et ne peut donc s'appliquer aux autres types de mutations (85 % des cas). Les thérapies associées à l'utrophine (protéine homologue de la dystrophine) ouvrent une nouvelle voie de recherche ne présentant pas ces inconvénients.

SUREXPRESSON DE L'UTROPHINE

La découverte de l'utrophine (Fig. 2) par les équipes de Kay Davies et Michel Fardeau a ouvert un nouvel axe de recherche dans les traitements de la DMD et de la BMD (Love *et al.*, 1989 ; Fardeau *et al.*, 1990). En effet, plusieurs critères ont suggéré très rapidement l'hypothèse

d'un remplacement possible de la dystrophine par l'utrophine. Cette hypothèse a été testée par l'étude de souris transgéniques pour le gène de l'utrophine (souris *mdx* utr^{-/-} et souris *mdx* sur-exprimant l'utrophine) (Tinsley *et al.*, 1996; Deconinck *et al.*, 1997; Tinsley *et al.*, 1998).

L'utrophine

L'utrophine est une protéine de 395 kDa présentant 80 % d'homologie avec la dystrophine (Blake *et al.*, 1996), localisée dans le muscle sain et dans le muscle dystrophique sous la membrane des fibres musculaires au niveau des jonctions neuromusculaires (JNM) et myotendineuses (JMT). Elle est localisée sur le chromosome 6 chez l'Homme (chromosome 10 chez la souris) (Love *et al.*, 1989). Deux promoteurs ont été décrits, qui permettent l'expression de la forme entière de la protéine (Denin *et al.*, 1996; Burton *et al.*, 1999), trois autres promoteurs localisés en aval des précédents permettent l'expression d'isoformes tronquées de la protéine. Comme dans le cas de la dystrophine, on retrouve un domaine N-terminal permettant la fixation à l'actine du cytosquelette, un domaine central composé de motifs répétés de 109 acides aminés (moins de répétitions que pour la dystrophine), un domaine riche en cystéine et le domaine C-terminal qui permet la liaison avec un complexe composé de protéines et de glycoprotéines (identique au complexe associé à la dystrophine) (Matsumura *et al.*, 1992), faisant le lien avec la matrice extracellulaire.

L'utrophine pour remplacer la dystrophine

UTROPHINE/DYSTROPHINE

L'hypothèse de départ repose sur l'homologie entre les deux protéines. Cette homologie s'étend sur la séquence complète des acides aminés de la protéine, avec une conservation des principaux sites d'interaction avec les membres du complexe protéique associé à la dystrophine. L'utrophine est d'abord exprimée tout le long du sarcolemme chez le fœtus avant que son expression ne soit limitée à la jonction neuromusculaire chez l'adulte. Elle est remplacée par la dystrophine dans les zones extrasynaptiques chez les sujets sains. Ces observations indiquent que l'utrophine pourrait jouer le rôle de la dystrophine lorsque cette dernière est absente (Tome *et al.*, 1994; Lin & Burgunder, 2000). De plus, l'utrophine étant naturellement exprimée à un faible niveau chez l'enfant DMD, elle est reconnue par l'organisme et le système immunitaire ne fabrique pas d'anticorps. Par contre, lorsqu'on tente de faire réexprimer la dystrophine chez un patient DMD, le risque de réaction immunitaire est grand, puisque l'organisme malade ne connaît pas la dystrophine.

IMPORTANCE DE L'UTROPHINE DANS LE MUSCLE

Le rôle de l'utrophine a été démontré chez des souris *mdx* dont le gène de l'utrophine a également été invalidé (souris *dko-mdx utr^{-/-}*). Ces souris double knock-out ont un phénotype beaucoup plus sévère que la souris *mdx*, comparable à celui décrit chez un patient DMD. Cette double

mutation provoque une mort prématurée. Les animaux présentent une anomalie des jonctions neuromusculaires et myotendineuses (Deconinck *et al.*, 1997), une diminution importante de la force isométrique et de la résistance aux contractions excentriques des muscles soléaire, *EDL* et diaphragme (Deconinck *et al.*, 1998). De plus, les muscles extraoculaires qui ne présentent aucun signe dystrophique chez la souris *mdx* et les enfants DMD sont très atteints chez la souris double knock-out (Porter *et al.*, 1998). L'expression d'une utrophine tronquée chez ces souris double knock-out permet de prévenir la mort prématurée ainsi que l'ensemble des signes cliniques décrits ci-dessus. L'ensemble de ces résultats montre de manière non équivoque l'importance du rôle de l'utrophine dans le muscle.

LA SUREXPRESSION D'UTROPHINE CHEZ LA SOURIS MDX

Afin d'étudier les effets de la surexpression de l'utrophine chez la souris *mdx*, le groupe de Kay Davies a établi plusieurs lignées de souris transgéniques pour l'utrophine. L'expression d'un transgène codant une utrophine tronquée permet de réduire très significativement les signes de la pathologie chez la souris *mdx* : diminution de 75 % du taux sanguin de créatine kinase, réduction importante du nombre de fibres centronucléées, re-localisation sous le sarcolemme du complexe de protéines associées à la dystrophine, et diminution de la dégénérescence et de la fibrose du diaphragme (Tinsley *et al.*, 1996). De plus, l'expression du transgène tronqué de l'utrophine améliore l'ensemble des performances mécaniques du muscle et semble restaurer une concentration normale du Ca²⁺ dans le cytosol. Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant un transgène qui code pour la forme entière de l'utrophine (Tinsley *et al.*, 1998). Les études chez les souris transgéniques ont également permis de répondre à deux questions importantes. La première était de savoir si la surexpression de l'utrophine devait se limiter à la structure musculaire ou si elle pouvait être ubiquitaire (distribution naturelle de la protéine). La surexpression du transgène de l'utrophine dans différents tissus ne révèle aucune toxicité, ce qui indique que le ciblage musculaire de la thérapie n'est pas nécessaire (Fisher *et al.*, 2001). La seconde question était de déterminer quel était le moment le plus propice pour la surexpression de l'utrophine dans le cadre d'une thérapie. La réponse à cette question a été obtenue par l'utilisation de souris transgéniques chez lesquelles l'expression du transgène de l'utrophine est contrôlée par un système inductible (tétracycline). Cette étude montre que la régression du phénotype dystrophique est d'autant plus importante que la surexpression d'utrophine est précoce. Cette étude montre également une corrélation directe entre le niveau de surexpression de l'utrophine et la régression du phénotype dystrophique (Squire *et al.*, 2002).

Les traitements envisagés

LES THÉRAPIES CELLULAIRES ET GÉNIQUES

Les vecteurs utilisés pour cibler la dystrophine sont également exploitables pour l'utrophine. L'intérêt de ces

études porte sur l'absence de réponse immunitaire contre l'utrophine après injection de myoblastes transformés pour surexprimer l'utrophine, ou l'injection de vecteurs contrôlant l'expression de cette protéine. Cependant le problème de migration du matériel injecté persiste. L'expression d'utrophine après transfert du gène par un adénovirus a été faite par injection dans le *Tibialis* de souris *mdx*. Environ 32 % des fibres ont été transfectées chez des animaux jeunes (1 à 3 jours) et une nette régression de la maladie (similaire à celle décrite chez les souris transgéniques pour l'utrophine) a été observée. Cependant, l'efficacité s'est avérée beaucoup plus faible sur des souris plus âgées (30-45 jours) (Gilbert *et al.*, 1999). Par ailleurs, les effets de la thérapie génique ont été comparés suivant la nature du gène introduit (dystrophine ou utrophine), et cette comparaison a permis de dégager un avantage thérapeutique significatif en faveur de l'utrophine (Ebihara *et al.*, 2000).

LES THÉRAPIES PHARMACOLOGIQUES

L'utrophine étant naturellement exprimée chez le malade, le but de cette thérapie n'est pas d'exprimer un gène mais simplement de chercher à activer son expression naturelle. Peu de recherches ont été menées dans ce domaine. Seulement cinq molécules (ou classes de molécules) ont été décrites pour leur capacité à augmenter l'expression de l'utrophine.

Les glucocorticoïdes

L'étude des glucocorticoïdes a débuté bien avant la découverte de l'existence de l'utrophine. Leur mode d'action reste indéterminé mais trois groupes ont montré une augmentation de la quantité d'utrophine après traitement de cellules en culture par la dexaméthasone ou la prednisolone (Passaquin *et al.*, 1993 ; Pasquini *et al.*, 1995 ; Courdier-Fruh *et al.*, 2002). Cette dernière permet une augmentation de 35 % de la quantité d'utrophine 5 à 7 jours après le début de la fusion des myotubes. Cette augmentation n'étant pas associée à une élévation de la quantité de transcrite pour l'utrophine, il semblerait que le mécanisme impliqué soit une stabilisation de la protéine ou une protection contre sa dégradation par les calpaïnes.

L'interleukine 6

Parmi les différentes interleukines testées, seul l'interleukine 6 a provoqué une augmentation de la quantité d'utrophine après injection chez des souris *mdx* néonatales. Cependant, cet effet ne dure qu'une semaine, et n'est pas clairement établi chez la souris saine (Fujimori *et al.*, 2002).

L'agrine

L'agrine, facteur libéré par les motoneurons, contrôle la différenciation post-synaptique de la jonction neuromusculaire et la mise en place des récepteurs de l'acétylcholine (AChR). Le traitement de myotubes en culture permet une augmentation d'un facteur 2 de l'ARNm de l'utrophine, par activation du promoteur de l'utrophine (la nature du promoteur, A ou B, n'a pas été rapportée à

l'heure actuelle) (Gramolini *et al.*, 1998). Les effets de l'agrine *in vivo* ne sont pas connus.

L'héréguline

L'héréguline est un autre facteur neuronal, membre de la famille des neurégulines. Le traitement des souris *mdx* par l'héréguline reverse le phénotype dystrophique (Krag *et al.*, 2004). La stimulation de la transcription se fait par la liaison du facteur de transcription GABP sur l'élément N-box du promoteur de l'utrophine (Gramolini *et al.*, 1999 ; Khurana *et al.*, 1999). Les deux voies agrine et héréguline semblent liées : l'agrine induirait une accumulation locale d'héréguline, ce qui déclencherait une activation transcriptionnelle du gène de l'utrophine (Gramolini *et al.*, 1999).

La calcineurine

Cette étude a pour origine l'observation que les fibres oxydatives (fibres lentes-type soléaire) contiennent 4 fois plus d'ARNm de l'utrophine que les fibres glycolytiques (fibres rapides-EDL). L'hypothèse d'un rôle de la calcineurine sur l'expression d'utrophine a été avancée car les fibres oxydatives ont une concentration élevée en Ca²⁺ intracellulaire qui stimulerait la calcineurine *via* la calmoduline. L'implication directe de la voie de signalisation calcineurine/NFAT dans l'expression de l'utrophine A a été démontrée : l'expression du transcrite de l'utrophine A est augmentée chez des souris transgéniques qui expriment une forme active de la calcineurine (CnA*) (Chakkalakal *et al.*, 2003b).

Chez des souris *mdx* croisées avec des souris CnA*, cette voie est stimulée, atténuant le phénotype dystrophique *mdx* ; on observe alors une restauration du complexe protéique associé à l'utrophine, une amélioration de l'intégrité membranaire, une réduction de la proportion de fibres centronucléées. Ces résultats indiquent que la recherche de composés stimulant l'activité calcineurine est une voie thérapeutique envisageable. (Chakkalakal *et al.*, 2003a).

La voie du monoxyde d'azote

L'hypothèse de départ repose sur le rapprochement de différentes études. En effet, la littérature indique que l'enzyme qui synthétise le monoxyde d'azote (NO), la NO synthase (NOS), est abondante dans le muscle au niveau de la jonction neuromusculaire, de la jonction myotendineuse et des cellules satellites (Kusner & Kaminski, 1996 ; Chao *et al.*, 1997), zones où l'utrophine est exprimée chez l'adulte. Au niveau de ces structures, la NOS est une des rares protéines à posséder une activité enzymatique. Cette observation d'une présence conjointe de l'utrophine et de la nNOS (forme neuronale de l'enzyme) nous a conduit à formuler l'hypothèse selon laquelle le NO pourrait induire l'expression de l'utrophine. Cette hypothèse a été vérifiée sur des cultures cellulaires et chez des souris saines et dystrophiques par traitement avec de la L-arginine, substrat des NOS (Chaubourt *et al.*, 1999 ; Chaubourt *et al.*, 2000 ; Chaubourt *et al.*, 2002). Ces études montrent une augmentation de la quantité d'utrophine *in vitro* et *in vivo* pour

l'ensemble des muscles de la patte étudiés. La comparaison de ce traitement avec les précédents met en évidence deux avantages en faveur de l'augmentation d'expression de l'utrophine par le NO : 1) A la différence de l'agrine, de l'héréguline, et des glucocorticoïdes, la L-arginine permet une augmentation de la quantité d'utrophine *in vitro* et *in vivo*; 2) L'augmentation du niveau d'utrophine observée en culture cellulaire est 10 fois plus importante que par traitement avec les autres composés.

Nous avons suivi l'évolution des signes caractéristiques de la DMD après le traitement de souris *mdx* par la L-arginine. Après 6 semaines de traitement quotidien avec la L-arginine (200 mg/kg), une amélioration globale des paramètres cliniques de la maladie a été observée. L'analyse par résonance magnétique nucléaire (technique non invasive) de la structure musculaire des pattes des souris traitées indique une diminution de la nécrose supérieure à 35 % et une relocalisation sous le sarcolemme du complexe de protéines associées à la dystrophine. De plus, le taux de créatine kinase sérique, anormalement élevé lors des cas de dystrophie, est fortement réduit (57 %) chez les souris traitées, de même que les infiltrations de lipides et de collagène dans le diaphragme, muscle le plus affecté chez la souris *mdx* (Voisin *et al.*, *Neurobiol. Dis.*, in press).

CONCLUSIONS

La découverte de l'utrophine à la fin des années 1980 a ouvert de nouvelles perspectives pour le développement de thérapies des dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker, en particulier en recherchant à pallier la déficience en dystrophine par l'expression d'utrophine. L'intérêt de cet axe de recherche est la possibilité de réactiver l'expression de l'utrophine musculaire par simple traitement pharmacologique et ainsi de s'affranchir des difficultés techniques rencontrées lors de l'utilisation de vecteurs viraux pour la thérapie génique ou de myoblastes et de cellules embryonnaires pour la thérapie cellulaire. Le traitement pharmacologique visant à surexprimer l'utrophine est sans aucun doute le plus proche d'aboutir, il devrait constituer un traitement alternatif pour la DMD et la BMD, dans l'attente d'un traitement curatif par une autre voie thérapeutique.

Remerciements. – Ce travail a reçu le soutien de l'Association Française Contre les Myopathies (AFM) et de la Muscular Dystrophy Association (MDA). Vincent Voisin est boursier de l'AFM. Nous remercions le Dr. Philippe Fossier pour sa relecture critique du manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

- Aartsma-Rus A., Janson A. A., Kaman W. E., Bremmer-Bout M., Den Dunnen J. T., Baas F., Van Ommen G. J. & Van Deutekom J. C., Therapeutic antisense-induced exon skipping in cultured muscle cells from six different DMD patients. *Hum. Mol. Genet.*, 2003, 12, 907-914.
- Abdel Meguid I. E., Specker T., Smith R. & Abdel Salam E., Effect of carnitine on muscle power and purine metabolism in Duchenne muscular dystrophy patients. *Acta Myologica*, 2000, 19, 215-219.
- Bartlett R. J., Stockinger S., Denis M. M., Bartlett W. T., Inverardi L., Le T. T., Thi Man N., Morris G. E., Bogan D. J., Metcalf-Bogan J. & Kornegay J. N., *In vivo* targeted repair of a point mutation in the canine dystrophin gene by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Nat. Biotechnol.*, 2000, 18, 615-622.
- Barton E. R., Morris L., Musaro A., Rosenthal N. & Sweeney H. L., Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in *mdx* mice. *J. Cell. Biol.*, 2002, 157, 137-148.
- Barton-Davis E.R., Cordier L., Shoturma D.I., Leland S.E. & Sweeney H.L., Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of *mdx* mice. *J Clin Invest.* 1999, 104, 375-381.
- Becker P. E. & Kiener F., A new x-chromosomal muscular dystrophy. *Arch. Psychiatr. Nervenkr. Z Neurol. Psychiatr.*, 1955, 193, 427-448.
- Berthillier G., Eichenberger D., Carrier H. N., Guibaud P. & Got R., Carnitine metabolism in early stages of Duchenne muscular dystrophy. *Clin. Chim. Acta*, 1982, 122, 369-375.
- Bertoni C. & Rando T. A., Dystrophin gene repair in *mdx* muscle precursor cells *in vitro* and *in vivo* mediated by RNA-DNA chimeric oligonucleotides. *Hum. Gene Ther.*, 2002, 13, 707-718.
- Blake D. J., Tinsley J. M. & Davies K. E., Utrophin: a structural and functional comparison to dystrophin. *Brain Pathol.*, 1996, 6, 37-47.
- Blake D. J., Weir A., Newey S. E. & Davies K. E., Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol. Rev.*, 2002, 82, 291-329.
- Bogdanovich S., Krag T. O., Barton E. R., Morris L. D., Whitmore L. A., Ahima R. S. & Khurana T. S., Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature*, 2002, 420, 418-421.
- Bonilla E., Samitt C. E., Miranda A. F., Hays A. P., Salvati G., DiMauro S., Kunkel L. M., Hoffman E. P. & Rowland L. P., Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell*, 1988, 54, 447-452.
- Bulfield G., Siller W. G., Wight P. A. & Moore K. J., X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 1189-1192.
- Burton E. A., Tinsley J. M., Holzfeind P. J., Rodrigues N. R. & Davies K. E., A second promoter provides an alternative target for therapeutic up-regulation of utrophin in Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 14025-14030.
- Byers T. J., Kunkel L. M. & Watkins S. C., The subcellular distribution of dystrophin in mouse skeletal, cardiac, and smooth muscle. *J. Cell. Biol.*, 1991, 115, 411-421.
- Campbell K. P. & Kahl S. D., Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature*, 1989, 338, 259-262.
- Carpenter S., Karpati G., Zubrzycka-Gaarn E., Bulman D. E., Ray P. N. & Worton R. G., Dystrophin is localized to the plasma membrane of human skeletal muscle fibers by electron-microscopic cytochemical study. *Muscle Nerve*, 1990, 13, 376-380.
- Chakkalakal J. V., Harrison M. A., Carbonetto S., Chin E., Michel R. N. & Jasmin B. J., Stimulation of calcineurin signaling attenuates the dystrophic pathology in *mdx* mice. *Hum. Mol. Genet.*, 2003a.
- Chakkalakal J. V., Stocksley M. A., Harrison M. A., Angus L. M., Deschenes-Furry J., St-Pierre S., Megeny L. A., Chin E. R., Michel R. N. & Jasmin B. J., Expression of utrophin mRNA correlates with the oxidative capacity of skeletal

- muscle fiber types and is regulated by calcineurin/NFAT signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003b, 100, 7791-7796.
- Chao D. S., Silvagno F., Xia H., Cornwell T. L., Lincoln T. M. & Bredt D. S., Nitric oxide synthase and cyclic GMP-dependent protein kinase concentrated at the neuromuscular endplate. *Neuroscience*, 1997, 76, 665-672.
- Chaubourt E., Fossier P., Baux G., Leprince C., Israel M. & De La Porte S., Nitric oxide and l-arginine cause an accumulation of utrophin at the sarcolemma: a possible compensation for dystrophin loss in Duchenne muscular dystrophy. *Neurobiol. Dis.*, 1999, 6, 499-507.
- Chaubourt E., Voisin V., Fossier P., Baux G., Israel M. & de La Porte S., The NO way to increase muscular utrophin expression? *C. R. Acad. Sci. III*, 2000, 323, 735-740.
- Chaubourt E., Voisin V., Fossier P., Baux G., Israel M. & De La Porte S., Muscular nitric oxide synthase (muNOS) and utrophin. *J. Physiol. Paris*, 2002, 96, 43-52.
- Chevron M. P., Girard F., Claustres M. & Demaille J., Expression and subcellular localization of dystrophin in skeletal, cardiac and smooth muscles during the human development. *Neuromuscul. Disord.*, 1994, 4, 419-432.
- Cole-Strauss A., Yoon K., Xiang Y., Byrne B. C., Rice M. C., Gryn J., Holloman W. K. & Kmiec E. B., Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonucleotide. *Science*, 1996, 273, 1386-1389.
- Courdier-Fruh I., Barman L., Briguet A. & Meier T., Glucocorticoid-mediated regulation of utrophin levels in human muscle fibers. *Neuromuscul. Disord.*, 2002, 12 (Suppl. 1), S95-S104.
- Davies K. E., Pearson P. L., Harper P. S., Murray J. M., O'Brien T., Sarfarazi M. & Williamson R., Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the Duchenne muscular dystrophy locus on the short arm of the human X chromosome. *Nucleic Acids Res.*, 1983, 11, 2303-2312.
- De Angelis F. G., Sthandier O., Berarducci B., Toso S., Galluzzi G., Ricci E., Cossu G. & Bozzoni I., Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon 51 of the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in Delta 48-50 DMD cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 9456-9461.
- De la Porte S., Morin S. & Koenig J., Characteristics of skeletal muscle in mdx mutant mice. *Int. Rev. Cytol.*, 1999, 191, 99-148.
- De Luca A., Pierno S., Liantonio A., Cetrone M., Camerino C., Simonetti S., Papadia F. & Camerino D. C., Alteration of excitation-contraction coupling mechanism in extensor digitorum longus muscle fibres of dystrophic mdx mouse and potential efficacy of taurine. *Br. J. Pharmacol.*, 2001, 132, 1047-1054.
- Deconinck A. E., Rafael J. A., Skinner J. A., Brown S. C., Potter A. C., Metzinger L., Watt D. J., Dickson J. G., Tinsley J. M. & Davies K. E., Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, 1997, 90, 717-727.
- Deconinck N., Rafael J. A., Beckers-Bleux G., Kahn D., Deconinck A. E., Davies K. E. & Gillis J. M., Consequences of the combined deficiency in dystrophin and utrophin on the mechanical properties and myosin composition of some limb and respiratory muscles of the mouse. *Neuromuscul. Disord.*, 1998, 8, 362-370.
- Delaughter M. C., Taffet G. E., Fiorotto M. L., Entman M. L. & Schwartz R. J., Local insulin-like growth factor I expression induces physiologic, then pathologic, cardiac hypertrophy in transgenic mice. *Faseb J.*, 1999, 13, 1923-1929.
- Den Dunnen J. T., Grootsholten P. M., Bakker E., Blonden L. A., Ginjaar H. B., Wapenaar M. C., van Paassen H. M., van Broeckhoven C., Pearson P. L. & van Ommen G. J., Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am. J. Hum. Genet.*, 1989, 45, 835-847.
- Dennis C. L., Tinsley J. M., Deconinck A. E. & Davies K. E., Molecular and functional analysis of the utrophin promoter. *Nucleic Acids Res.*, 1996, 24, 1646-1652.
- Dickson G., Hill V. & Graham I. R., Screening for antisense modulation of dystrophin pre-mRNA splicing. *Neuromuscul. Disord.*, 2002, 12 (Suppl. 1), S67-S70.
- Dunant P., Walter M. C., Karpati G. & Lochmuller H., Gentamicin fails to increase dystrophin expression in dystrophin-deficient muscle. *Muscle Nerve*, 2003, 27, 624-627.
- Dunckley M. G., Manoharan M., Villiet P., Eperon I. C. & Dickson G., Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides. *Hum. Mol. Genet.*, 1998, 7, 1083-1090.
- Ebihara S., Guibinga G. H., Gilbert R., Nalbantoglu J., Massie B., Karpati G. & Petrof B. J., Differential effects of dystrophin and utrophin gene transfer in immunocompetent muscular dystrophy (mdx) mice. *Physiol. Genomics*, 2000, 3, 133-144.
- Emanuel B. S., Zackai E. H. & Tucker S. H., Further evidence for Xp21 location of Duchenne muscular dystrophy (DMD) locus: X;9 translocation in a female with DMD. *J. Med. Genet.*, 1983, 20, 461-463.
- Engert J. C., Berglund E. B. & Rosenthal N., Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. *J. Cell. Biol.*, 1996, 135, 431-440.
- England S. B., Nicholson L. V., Johnson M. A., Forrest S. M., Love D. R., Zubrzycka-Gaarn E. E., Bulman D. E., Harris J. B. & Davies K. E., Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46 % of dystrophin. *Nature*, 1990, 343, 180-182.
- Ervasti J. M., Ohlendieck K., Kahl S. D., Gaver M. G. & Campbell K. P., Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature*, 1990, 345, 315-319.
- Fardeau M., Tome F. M., Collin H., Augier N., Pons F. & Leger J., Presence of dystrophine-like protein at the neuromuscular junction in Duchenne muscular dystrophy and in "mdx" mutant mice. *C. R. Acad. Sci. III*, 1990, 311, 197-204.
- Finsterer J. & Stollberger C., The heart in human dystrophinopathies. *Cardiology*, 2003, 99, 1-19.
- Fisher R., Tinsley J. M., Phelps S. R., Squire S. E., Townsend E. R., Martin J. E. & Davies K. E., Non-toxic ubiquitous over-expression of utrophin in the mdx mouse. *Neuromuscul. Disord.*, 2001, 11, 713-721.
- Fujimori K., Itoh Y., Yamamoto K., Miyagoe-Suzuki Y., Yuasa K., Yoshizaki K., Yamamoto H. & Takeda S., Interleukin 6 induces overexpression of the sarcolemmal utrophin in neonatal mdx skeletal muscle. *Hum. Gene Ther.*, 2002, 13, 509-518.
- Gebski B. L., Mann C. J., Fletcher S. & Wilton S. D., Morpholino antisense oligonucleotide induced dystrophin exon 23 skipping in mdx mouse muscle. *Hum. Mol. Genet.*, 2003, 12, 1801-1811.
- Gilbert R., Nalbantoglu J., Petrof B. J., Ebihara S., Guibinga G. H., Tinsley J. M., Kamen A., Massie B., Davies K. E. & Karpati G., Adenovirus-mediated utrophin gene transfer mitigates the dystrophic phenotype of mdx mouse muscles. *Hum. Gene Ther.*, 1999, 10, 1299-1310.
- Gillis J. M., Understanding dystrophinopathies: an inventory of the structural and functional consequences of the absence of dystrophin in muscles of the mdx mouse. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 1999, 20, 605-625.
- Gramolini A. O., Angus L. M., Schaeffer L., Burton E. A., Tinsley J. M., Davies K. E., Changeux J. P. & Jasmin B. J., Induction of utrophin gene expression by heregulin in skeletal muscle cells: role of the N-box motif and GA binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 3223-3227.
- Gramolini A. O., Burton E. A., Tinsley J. M., Ferns M. J., Cartaud A., Cartaud J., Davies K. E., Lunde J. A. & Jasmin

- B. J., Muscle and neural isoforms of agrin increase utrophin expression in cultured myotubes via a transcriptional regulatory mechanism. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 736-743.
- Gregorevic P., Plant D. R., Leeding K. S., Bach L. A. & Lynch G. S., Improved contractile function of the *mdx* dystrophic mouse diaphragm muscle after insulin-like growth factor-I administration. *Am. J. Pathol.*, 2002, 161, 2263-2272.
- Hoffman E. P., Fischbeck K. H., Brown R. H., Johnson M., Medori R., Loike J. D., Harris J. B., Waterston R., Brooke M., Specht L. *et al.*, Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.*, 1988, 318, 1363-1368.
- Howard M. T., Shirts B. H., Petros L. M., Flanigan K. M., Gesteland R. F. & Atkins J. F., Sequence specificity of aminoglycoside-induced stop codon readthrough: potential implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.*, 2000, 48, 164-169.
- Ibraghimov-Beskrovnaya O., Ervasti J. M., Leveille C. J., Slaughter C. A., Sernett S. W. & Campbell K. P., Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*, 1992, 355, 696-702.
- Khurana T. S., Rosmarin A. G., Shang J., Krag T. O., Das S. & Gammeltoft S., Activation of utrophin promoter by heregulin via the ets-related transcription factor complex GA-binding protein α/β . *Mol. Biol. Cell.*, 1999, 10, 2075-2086.
- Kinali M., Mercuri E., Main M., Muntoni F. & Dubowitz V., An effective, low-dosage, intermittent schedule of prednisolone in the long-term treatment of early cases of Duchenne dystrophy. *Neuromuscul. Disord.*, 2002, 12 (Suppl. 1), S169-S174.
- Kirk S., Oldham J., Kambadur R., Sharma M., Dobbie P. & Bass J., Myostatin regulation during skeletal muscle regeneration. *J. Cell. Physiol.*, 2000, 184, 356-363.
- 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.
- Krag T. O., Bogdanovich S., Jensen C. J., Fischer M. D., Hansen-Schwartz J., Javazon E. H., Flake A. W., Edvinsson L. & Khurana T. S., Heregulin ameliorates the dystrophic phenotype in *mdx* mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, 13856-13860.
- Kusner L. L. & Kaminski H. J., Nitric oxide synthase is concentrated at the skeletal muscle endplate. *Brain Res.*, 1996, 730, 238-242.
- Langley B., Thomas M., Bishop A., Sharma M., Gilmour S. & Kambadur R., Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 49831-49840.
- Leijendekker W. J., Passaquin A. C., Metzinger L. & Ruegg U. T., Regulation of cytosolic calcium in skeletal muscle cells of the *mdx* mouse under conditions of stress. *Br. J. Pharmacol.*, 1996, 118, 611-616.
- Lin S. & Burgunder J. M., Utrophin may be a precursor of dystrophin during skeletal muscle development. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 2000, 119, 289-295.
- Love D. R., Hill D. F., Dickson G., Spurr N. K., Byth B. C., Marsden R. F., Walsh F. S., Edwards Y. H. & Davies K. E., An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature*, 1989, 339, 55-58.
- Lu Q. L., Morris G. E., Wilton S. D., Ly T., Artem'yeva O. V., Strong P. & Partridge T. A., Massive idiosyncratic exon skipping corrects the nonsense mutation in dystrophic mouse muscle and produces functional revertant fibers by clonal expansion. *J. Cell. Biol.*, 2000, 148, 985-996.
- Mann C. J., Honeyman K., McClorey G., Fletcher S. & Wilton S. D., Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the *mdx* mouse model of muscular dystrophy. *J. Gene Med.*, 2002, 4, 644-654.
- Matsumura K., Burghes A. H., Mora M., Tome F. M., Morandi L., Cornello F., Leturcq F., Jeanpierre M., Kaplan J. C., Reinert P. *et al.*, Immunohistochemical analysis of dystrophin-associated proteins in Becker/Duchenne muscular dystrophy with huge in-frame deletions in the NH2-terminal and rod domains of dystrophin. *J. Clin. Invest.*, 1994, 93, 99-105.
- Matsumura K., Ervasti J. M., Ohlendieck K., Kahl S. D. & Campbell K. P., Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in *mdx* mouse muscle. *Nature*, 1992, 360, 588-591.
- Matsumura K., Nonaka I., Tome F. M., Arahata K., Collin H., Leturcq F., Recan D., Kaplan J. C., Fardeau M. & Campbell K. P., Mild deficiency of dystrophin-associated proteins in Becker muscular dystrophy patients having in-frame deletions in the rod domain of dystrophin. *Am. J. Hum. Genet.*, 1993, 53, 409-416.
- McIntosh L., Granberg K. E., Briere K. M. & Anderson J. E., Nuclear magnetic resonance spectroscopy study of muscle growth, *mdx* dystrophy and glucocorticoid treatments: correlation with repair. *NMR Biomed.*, 1998, 11, 1-10.
- Mizuno Y., Yoshida M., Nonaka I., Hirai S. & Ozawa E., Expression of utrophin (dystrophin-related protein) and dystrophin-associated glycoproteins in muscles from patients with Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, 1994, 17, 206-216.
- Monaco A. P., Bertelson C. J., Middlesworth W., Colletti C. A., Aldridge J., Fischbeck K. H., Bartlett R., Pericak-Vance M. A., Roses A. D. & Kunkel L. M., Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. *Nature*, 1985, 316, 842-845.
- Muntoni F., Fisher I., Morgan J. E. & Abraham D., Steroids in Duchenne muscular dystrophy: from clinical trials to genomic research. *Neuromuscul. Disord.*, 2002, 12 (Suppl. 1), S162-S165.
- Ohlendieck K. & Campbell K. P., Dystrophin constitutes 5 % of membrane cytoskeleton in skeletal muscle. *FEBS Lett.*, 1991a, 283, 230-234.
- Ohlendieck K. & Campbell K. P., Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from *mdx* mice. *J. Cell. Biol.*, 1991b, 115, 1685-1694.
- Ohlendieck K., Matsumura K., Ionasescu V. V., Towbin J. A., Bosch E. P., Weinstein S. L., Sernett S. W. & Campbell K. P., Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin-associated proteins in the sarcolemma. *Neurology*, 1993, 43, 795-800.
- Palmer E., Wilhelm J. M. & Sherman F., Phenotypic suppression of nonsense mutants in yeast by aminoglycoside antibiotics. *Nature*, 1979, 277, 148-150.
- Pasquini F., Guerin C., Blake D., Davies K., Karpati G. & Holland P., The effect of glucocorticoids on the accumulation of utrophin by cultured normal and dystrophic human skeletal muscle satellite cells. *Neuromuscul. Disord.*, 1995, 5, 105-114.
- Passaquin A. C., Metzinger L., Leger J. J., Warter J. M. & Pointron P., Prednisolone enhances myogenesis and dystrophin-related protein in skeletal muscle cell cultures from *mdx* mouse. *J. Neurosci. Res.*, 1993, 35, 363-372.
- Passaquin A. C., Renard M., Kay L., Challet C., Mokhtarian A., Wallimann T. & Ruegg U. T., Creatine supplementation reduces skeletal muscle degeneration and enhances mitochondrial function in *mdx* mice. *Neuromuscul. Disord.*, 2002, 12, 174-182.
- Politano L., Nigro G., Nigro V., Piluso G., Papparella S., Paciello O. & Comi L. I., Gentamicin administration in Duchenne patients with premature stop codon. Preliminary results. *Acta Myol.*, 2003, 22, 15-21.
- Porter J. D., Rafael J. A., Ragusa R. J., Brueckner J. K., Trickett J. I. & Davies K. E., The sparing of extraocular muscle in

- dystrophinopathy is lost in mice lacking utrophin and dystrophin. *J. Cell. Sci.*, 1998, *111* (Pt 13), 1801-1811.
- Pulido S. M., Passaquin A. C., Leijendekker W. J., Challet C., Wallimann T. & Ruegg U. T., Creatine supplementation improves intracellular Ca²⁺ handling and survival in *mdx* skeletal muscle cells. *FEBS Lett.*, 1998, *439*, 357-362.
- Rando T. A., Disatnik M. H. & Zhou L. Z., Rescue of dystrophin expression in *mdx* mouse muscle by RNA/DNA oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, *97*, 5363-5368.
- Sherratt T. G., Vulliamy T., Dubowitz V., Sewry C. A. & Strong P. N., Exon skipping and translation in patients with frameshift deletions in the dystrophin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 1993, *53*, 1007-1015.
- Singh A., Ursic D. & Davies J., Phenotypic suppression and misreading *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 1979, *277*, 146-148.
- Sklar R. M. & Brown R. H., Jr., Methylprednisolone increases dystrophin levels by inhibiting myotube death during myogenesis of normal human muscle *in vitro*. *J. Neurol. Sci.*, 1991, *101*, 73-81.
- Squire S., Raymackers J. M., Vandebrouck C., Potter A., Tinsley J., Fisher R., Gillis J. M. & Davies K. E., Prevention of pathology in *mdx* mice by expression of utrophin: analysis using an inducible transgenic expression system. *Hum. Mol. Genet.*, 2002, *11*, 3333-3344.
- Thomas M., Langley B., Berry C., Sharma M., Kirk S., Bass J. & Kambadur R., Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J. Biol. Chem.*, 2000, *275*, 40235-40243.
- Tinsley J., Deconinck N., Fisher R., Kahn D., Phelps S., Gillis J. M. & Davies K., Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in *mdx* mice. *Nat. Med.*, 1998, *4*, 1441-1444.
- Tinsley J. M., Potter A. C., Phelps S. R., Fisher R., Trickett J. I. & Davies K. E., Amelioration of the dystrophic phenotype of *mdx* mice using a truncated utrophin transgene. *Nature*, 1996, *384*, 349-353.
- Tome F. M., Matsumura K., Chevally M., Campbell K. P. & Fardeau M., Expression of dystrophin-associated glycoproteins during human fetal muscle development: a preliminary immunocytochemical study. *Neuromuscul. Disord.*, 1994, *4*, 343-348.
- van Deutekom J. C., Bremmer-Bout M., Janson A. A., Ginjaar I. B., Baas F., den Dunnen J. T. & van Ommen G. J., Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum. Mol. Genet.*, 2001, *10*, 1547-1554.
- Voisin V., Sébrié C., Matecki S., Gillet B., Ramonatxo M., Israël M. & De La Porte S., Utrophin in *mdx* mice treated by L-arginine reverses dystrophic phenotype and improves mechanical performance. *Neurobiol. Dis.*, in press.
- Wagner K. R., Hamed S., Hadley D. W., Gropman A. L., Burstein A. H., Escolar D. M., Hoffman E. P. & Fischbeck K. H., Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann. Neurol.*, 2001, *49*, 706-711.
- Wagner K. R., McPherron A. C., Winik N. & Lee S. J., Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in *mdx* mice. *Ann. Neurol.*, 2002, *52*, 832-836.
- Wilton S. D., Dye D. E. & Laing N. G., Dystrophin gene transcripts skipping the *mdx* mutation. *Muscle Nerve*, 1997, *20*, 728-734.
- Yoon K., Cole-Strauss A. & Kmiec E. B., Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA.DNA oligonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, *93*, 2071-2076.
- Yoshida M. & Ozawa E., Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1990, *108*, 748-752.
- Yoshida M., Suzuki A., Yamamoto H., Noguchi S., Mizuno Y. & Ozawa E., Dissociation of the complex of dystrophin and its associated proteins into several unique groups by n-octyl β -D-glucoside. *Eur. J. Biochem.*, 1994, *222*, 1055-1061.
- Zubrzycka-Gaarn E. E., Bulman D. E., Karpati G., Burghes A. H., Belfall B., Klamut H. J., Talbot J., Hodges R. S., Ray P. N. & Worton R. G., The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature*, 1988, *333*, 466-469.