

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى -جيجل-

Université Mohammed Seddik Ben Yahia -Jijel-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Moléculaire et
Cellulaire



كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

Mémoire de Fin d'Etudes

En vue de l'obtention du diplôme : **Master Académique en Biologie**
Filière : Sciences Biologiques
Option : Biochimie

Thème

**Aspects moléculaires et cellulaires des
dystrophinopathies et nouvelles approches
thérapeutiques**

Membres du jury :

Président : Dr BOUTENNOUN Hanane

Examineur : M^{elle} REZZAGUI Abir

Encadrant : M^{me} BENSEGHIER Salima

Présenté par :

M^{elle} BAKHA Somia

M^{elle} BELHIMEUR Sarah

M^{elle} BOUCHAIR Randa

Année universitaire 2022-2023

Numéro d'ordre (bibliothèque).....

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

A decorative floral element with several flowers and leaves, positioned to the left of the calligraphic text.

Remerciements

*Après avoir rendu grâce à **Dieu** le Tout Puissant et le Miséricordieux nous tenons à remercier vivement tous ceux qui, de près ou de loin ont participé à la rédaction de ce document.*

*Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à notre cher professeur et encadrant Mme **Salima BENSEGHIER** pour son suivi et pour son énorme soutien, qu'il n'a cessé de nous prodiguer tout au long de la période du projet.*

*Nous adressons aussi mes vifs remerciements aux membres des jurys **Dr BOUTENNOUN Hanane** et **M^{elle} REZZAGUI Abir** pour avoir bien voulu examiner et juger ce travail. Mes remerciements vont à tout le personnel que j'ai contacté durant ma recherche.*

Nous ne laisserons pas cette occasion passer, sans remercier tous les enseignants de la faculté SNV de l'université de Jijel et particulièrement ceux de la section Biochimique pour leur aide et leurs précieux conseils et pour l'intérêt qu'ils portent à ma formation.

A nos parents, a nos frères et sœurs, nous adressons nos remerciements les plus chaleureuse pour leur compréhension, leur encouragement incessant, leurs soutiens, leurs disponibilités et leur aide.

Enfin, mes remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ce projet.

Dédicace



Je dédie ce travail :

*À mes chers parents « **Fadila** » et « **Kamal** » source de vie et d'amour pour leurs*

*Encouragements et leurs soutiens. Grâce à eux, j'ai pu réaliser ce grand exploit et
je leur suis*

Reconnaissant pour tous leurs efforts et leurs sacrifices.

*Puisse " Allah ", le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie
et bonheur.*

*À mes chers frères « **Yasser** » et « **Islam** ».*

A mon grand-père et ma grand-mère, que Dieu les guérisse et perpétue leur vie.

*Mes chères binômes : « **Sara** » et « **Somia** ».*

*À mon encadrante **Mme BENSEGHIER Salima** : vos conseils et l'orientation
pertinent, et votre gentillesse envers nous.*

Randa

Dédicace



*Avant tout, nous remercions **Allah** tout puissant qui avons donné le courage la force la volonté afin de pouvoir accomplir ce travail.*

*A mon paradis, à la prunelle de mes yeux à la source de ma joie et mon bonheur, ma lune et le fil d'espoir qui allumer mon chemin, ma moitié, mama **Hayat***

*A mon très cher père **Hocine** pour ses encouragements son soutien surtout pour son amour et son sacrifice afin que rien n'entrave le déroulement de mes études*

*A mon frère **Hamza** pour l'amour qu'il me réserve*

*A ma grande sœur **Khadija** qui n'ont pas cessée de mes conseiller encourager et soutenir tout au long de mes études*

*A ma petite sœur **Hadjer** qui est la joie et le bonheur pour toute la famille.*

*Ma chère grand-mère **Zainab**, que Dieu la protège et prolonge sa vie, et mes cousines **Safa, Lylia et Marwa***

*Mes binôme **Somia et Randa***

A tous mes amis et camarades de la promotion Biochimie 2022-2023

Merci d'être toujours là pour moi.

Sarah

Dédicace



Je dédie ce mémoire

À mes chers parents ma mère et mon père

Pour leurs patiences, leurs amours, leurs soutiens et leurs encouragements.

À mes sœurs Hanane, Merieme, Zineb, Nabila, Laila, Nadia et Naima.

À mon petit Yahia.

À ma chère amie Nor el Imane et mes chères binômes Sarah et Randa.

*Sans oublier tous les professeurs que ce soit du primaire, du moyen, du secondaire
ou de l'enseignement supérieur.*

Somia

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction..... 1

Chapitre I : Tissu musculaire

I.1 Muscles lisses..... 3

I.2. Muscle cardiaque..... 3

I.3. Muscle strié..... 4

I.3.1. Cellule satellite..... 5

I.3.2. Dégénérescence et régénérescence du muscle strié..... 5

I.3.3. Anatomie macroscopique d'un muscle squelettique 6

I.3.4. Organisation cellulaire 7

I.4. Fonction des muscles 8

I.5. Contraction et excitation musculaire 8

Chapitre II : Dystrophine

II.1. Gène de la dystrophine..... 11

II.2. Dystrophine..... 12

II.3. Complexe protéique associé à la dystrophine 12

II.4. Rôle de la dystrophine 14

Chapitre III : Dystrophies musculaires de Duchenne et Becker

III.1. Historique..... 15

III.2. Transmission de la maladie 16

III.3. Génétique de la maladie..... 17

III.4. Corrélation phénotype génotype DMD et BMD..... 18

III.5. Mécanisme moléculaire de l'atteinte musculaire.....	19
II.6. Aspect cellulaire.....	21
II.7. Altérations musculaires	23

Chapitre IV : Diagnostic des dystrophies musculaire de Duchenne et Becker

IV.1. Analyse cliniques et paracliniques.....	25
IV.2. Analyse biochimique.....	27
IV.2.1. Dosage des enzymes musculaires.....	27
IV.2.2. Électromyogramme.....	27
IV.3. Analyses histologiques immuno-histochimiques et western blotting.....	28
IV.3.1. Biopsie musculaire	28
IV.3.2. Imagerie musculaire.....	29
IV.4. Analyses moléculaires.....	29
IV.4.1. MLPA	30
IV.4.2. PCR Multiplex semi-quantitative	30
IV.4.3. Séquençage à haut débit (ou NGS).....	30
IV.4.4. RT-PCR	30
IV.4.5. Séquençage par la méthode de Sanger	30
IV.4.6. Test PTT	31

Chapitre V : Approches thérapeutiques

V.1. Thérapie classique.....	33
V.1.1. Thérapie pharmaceutique.....	33
V.1.2. Thérapie Génique	35
V.1.3. Translecture de codon stop.....	38
V.1.4. Saut d'exon.....	39
V.1.5. Utrophine.....	40
V.1.6. Thérapie cellulaire.....	41

V.1.6.1. Cellules souches multipotentes dérivées du muscle (CSMD).....	42
V.1.6.2. Cellules souches pluripotentes induites (CPSi).....	42
V.1.6.3. Cellules satellites	43
V.1.6.4. Mésoangioblastes, cellules souches sanguines et musculaires CD133+.....	43
V.2. Nouvelles approches thérapeutiques.....	43
V.2.1. Oligonucléotides thérapeutiques.....	43
V.2.2. Les oligonucléotiques antisens OSA chimiquement modifiés.....	44
V.3. Dernières avancées thérapeutique.....	46
V.3.1. Système de CRISPR-cas 9.....	46
Conclusion	49
Références Bibliographiques.....	50

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Coupe transversal simplifiée de l'intestin montrant deux couches de muscle lisse.....	3
02	Tissu musculaire cardiaque, Muscle cardiaque.....	4
03	Enveloppes de tissu conjonctif d'un muscle squelettique	5
04	Différenciation asymétrique d'une cellule satellite.....	6
05	Organisation subcellulaire du muscle strié squelettique.....	7
06	Libération du calcium et couplage excitation –contraction	10
07	Organisation génomique du gène de la dystrophine.....	11
08	Structure de la dystrophine	12
09	Illustration du complexe dystrophine – glycoprotéines	14
10	Transmission récessive liée au chromosome X par la mère.....	17
11	Représentation schématique des transcrits de la dystrophine chez les individus sains, chez des DMD et chez des BMD.....	18
12	Corrélation phénotype-génotype dans les dystrophinopathies.....	19
13	Principaux mécanismes physiopathologiques.....	21
14	Coupes histologiques du muscle de la dystrophie musculaire de Duchenne.....	22
15	Conséquences des déficits intrinsèques des cellules satellites dans la dystrophie Muscle de Duchenne	23
16	Mécanisme hypothétique de la réponse inflammatoire induite par un débordement de Ca ⁺² dans les muscles DMD.....	24
17	Aspects cliniques. Enfant atteint de maladie de Duchenne.....	26
18	Étude des protéines à partir de la biopsie musculaire.....	29
19	Principe de la thérapie génique.....	36
20	Étapes de la thérapie génique via la micro-dystrophine.....	37
21	Structure des mini- et microdystrophines.....	38

22	Translecture du codon stop.....	39
23	Complexes protéiques associés à la dystrophine et à l'utrophine.....	41
24	Sources possibles de cellules souches myogéniques isolées du sang et des muscles dans le traitement de la DMD.....	42
25	Restauration de protéines fonctionnelles par modulation d'épissage.....	44
26	Mécanismes d'Eteplirsén et de Viltolarsén dans la dystrophie musculaire de Duchenne.....	45
27	Mécanisme de Golodirsén et Casimersén dans la dystrophie musculaire de Duchenne.....	45
28	Mécanismes d'action du système CRISPR-Cas9.....	46
29	Mécanismes de la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) et de la correction génique médiée par la réparation dirigée par l'homologie (HDR) par des répétitions palindromiques courtes régulièrement espacées (CRISPR)-Cas9.....	48

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Locus géniques et défauts protéiques dans les formes les plus courantes de dystrophie musculaire.....	15
2	Concentration sérique de créatine phosphokinase dans les dystrophinopathies.....	27

Liste des abbreviations

AAV : Adeno-Associated Viruses
ABD : Actin Binding Domain
AFM : Association Française de Myopathie
BMD: Becker Muscular Dystrophy
CK : Créatine Kinase
DCM : Dystrophie Cardiomyopathie
DG : Dystroglycanes
DGC : Dystrophin Glycoprotein Complex
DHPR : Dihydro Pyridine Receptor
DMD : Duchenne Muscular Dystrophy
ECG : Electrocardiogramme
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
LDH : Lactate Déshydrogénase
MLPA : Multiplex Ligation-dependant Probe Amplification
NADPH oxydase: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NF- κ B: Nuclear Factor-kappa B
NGS: Next-Generation Sequencing
nNOS : neuronal Nitric Oxides Synthase
NO: Nitric Oxyde
PA: Potential d'Action
PTC 124 : Post-Transcriptional Control 124
ROS: Reactive Oxygen Species
RS : Réticulum Sarcoplasmique
RT-PCR: Real Time-PCR
RYR: Ryanodine Receptor
SERCA: Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase
SR: Sarcolemme
TNF α : Tumor Necrosis Factors α

Introduction

Les dystrophinopathies couvrent un spectre de rares maladies musculaires progressives liées à X, résultant de mutations du gène de la dystrophine. Elles font partie des dystrophies musculaires pédiatriques les plus courantes, la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) étant la forme la plus sévère et la dystrophie musculaire de Becker (BMD).

La DMD est une maladie qui touche environ 1 nouveau-né sur 5 000. Les premiers symptômes apparaissent à l'âge de 2 à 3 ans, caractérisée par une perte progressive de tissu musculaire et de fonction entraînant une dépendance au fauteuil roulant vers l'âge de 12 ans, le besoin d'une ventilation assistée vers l'âge de 20 ans et une mort prématurée (**Verhaart et al., 2019 ; Luce et al., 2021**). La BMD est caractérisée aussi par un déficit quantitatif ou fonctionnel de la protéine et par un tableau clinique moins sévère. L'incidence de la BMD est estimée à 5,42 pour 100 000 naissances (**Teslikas et al., 2010**).

A l'état normal, l'intégrité de tissu musculaire dynamique et plastique dépend de l'équilibre établi entre la synthèse et la dégradation des protéines qui le composent. Des facteurs, tels que la nutrition, l'équilibre hormonal, l'activité physique, le stress, ainsi de nombreuses mutations géniques fragilisent l'homéostasie du muscle. Les mutations interrompent le cadre de lecture, et entraînent une perte complète de l'expression de la dystrophine, ce qui provoque la DMD, alors d'autres, préservent le cadre de lecture, entraîne une dystrophine sous une forme mutée ou tronquée avec fonction réduite provoque la BMD. L'absence de dystrophine dans les fibres musculaires de patients DMD entraîne consécutivement la dégénérescence, la nécrose primaire des fibres, suivie de l'infiltration chronique de cellules inflammatoires et de l'accumulation de fibrose et de tissu adipeux intramusculaire (**Nakamura et al., 2009 ; Le Rumeur, 2015 ; Brun et al., 2016 ; Ballouhey et al., 2023**).

Le gène de la dystrophine est le plus grand gène humain connu, contenant 79 exons et s'étendant sur plus de 2,4 Mb, soit environ 0,1 % de l'ensemble du génome. La mutation la plus courante responsable de la DMD et de la BMD est une délétion couvrant un ou plusieurs exons. Ces suppressions représentent 60 % à 70 % de tous les DMD et 80 % à 85 % de cas de BMD. La dystrophine joue un rôle important dans le maintien de l'architecture cellulaire et permet la transduction du signal entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire (**Faysoil et al., 2008 ; Le Hir et al., 2013 ; Gao et al., 2015**).

En plus, des symptômes cliniques sont marquées avec une augmentation de la créatine kinase et une absence de la dystrophine. Cette dernière a été observée par marquage immunohistochimique de la biopsie musculaire, suivie d'un examen moléculaire tel que la

MLPA, la PCR, la NGS, la RT-PCR, le séquençage et le test PTT pour confirmer l'anomalie génétique (Desguerre et al., 2015 ; Lütschg, 2018 ; PNDS, 2019).

Notre mémoire est basé sur une recherche bibliographique qui sert à montrer l'aspect moléculaire et cellulaire des dystrophinopathies et mettre en avant les nouvelles approches thérapeutiques. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre mémoire qui se divise en cinq chapitres.

Dans le premier chapitre nous avons abordé les tissus musculaires, le deuxième chapitre est consacré à l'étude de physiologie de la dystrophine. Le troisième chapitre est dédié à dystrophie musculaires de Duchenne et Becker. Le quatrième chapitre est dédié au diagnostic des dystrophies musculaire de Duchenne et Becker. Enfin, dans le cinquième chapitre, nous citons les nouvelles approches thérapeutiques des dystrophinopathies et qui donne un peu d'espoir pour les patients souffrant de cette pathologie génétique.

Chapitre I
Tissu musculaire

Le tissu musculaire est un type de tissu hautement spécialisé, composé de cellules qui ont pour propriétés fondamentales l'excitabilité et la contractilité. Les éléments cellulaires qui composent ce type de tissu sont appelés fibres musculaires. Il existe trois types de tissu musculaire : squelettique, cardiaque et lisse. Les cellules des muscles (myocytes) squelettique et lisses à l'exception du muscle cardiaque ont une forme allongée appelées fibres musculaires. La contraction musculaire est assurée par deux sortes de myofilaments, qui sont les équivalents musculaires des microfilaments contenant de l'actine et de la myosine (Marieb, 2008 ; Cretoiu et al., 2018).

I.1. Muscles lisses

Les cellules musculaires lisses sont des cellules hautement dynamiques, ils ont des capacités de s'adapter aux modifications de la structure et de l'environnement chimique où elles résident, elles se trouvent principalement dans les parois des organes viscéraux creux tels que l'estomac, la vessie et les voies respiratoires. Leur fonction consiste à propulser des substances dans certaines voies de l'organisme (Figure 1) (Gerthoffer, 2005).

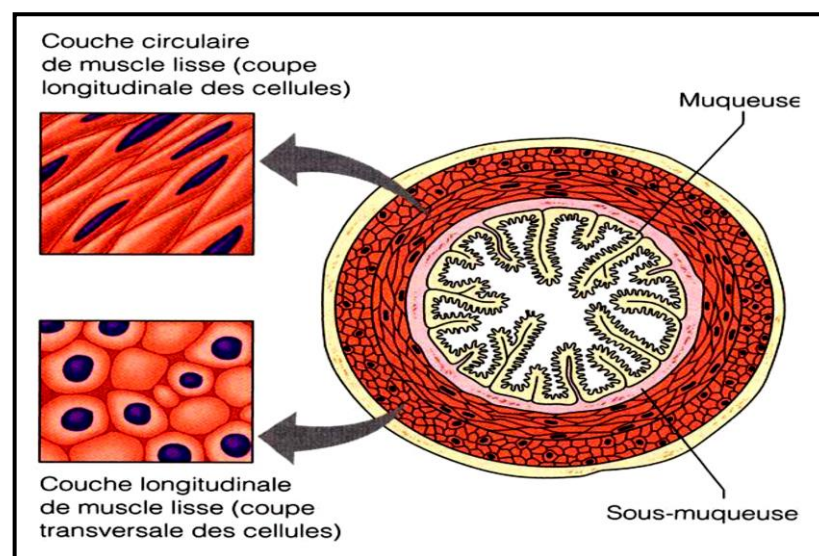


Figure 1 : Coupe transversal simplifiée de l'intestin montrant deux couches de muscle lisse (Marieb, 2008).

I.2. Muscle cardiaque

Le muscle cardiaque se trouve à un seul endroit dans l'organisme, le cœur, qui agit comme une pompe pour propulser le sang dans les vaisseaux sanguins et dans tous les tissus de l'organisme. Il est strié comme les muscles lisses et n'est pas soumis à la volonté (Figure 2) (Marieb, 2008).

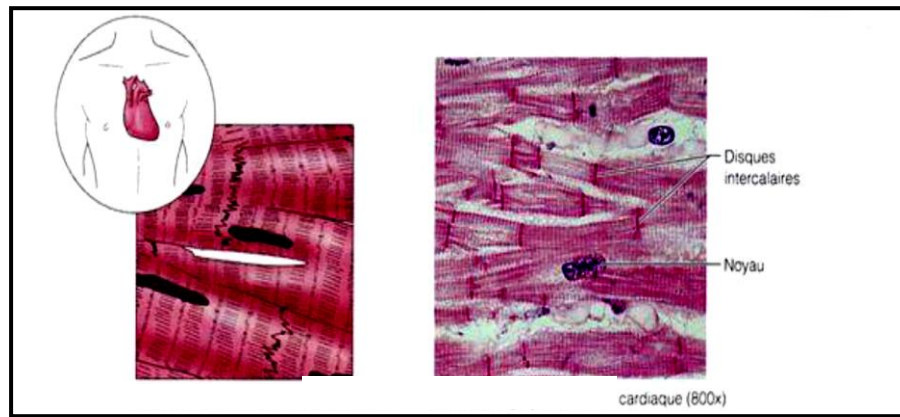


Figure 2 : Tissu musculaire cardiaque (800x) (Marieb, 2008).

I.3. Muscle strié

Le tissu musculaire strié se présente sous forme de muscles squelettiques, un ensemble d'organes qui recouvre le squelette osseux et s'y attachent. Les muscles squelettiques sont aussi appelés muscles volontaires parce qu'ils sont le seul type de muscle soumis à la volonté (Marieb, 2005).

Les fibres musculaires squelettiques (myocytes) sont les fibres musculaires les plus longues, elles portent des bandes transversales bien visibles nommées stries et peuvent être maîtrisées volontairement, bien qu'ils soient parfois activés par des réflexes. Chaque fibre musculaire est recouverte d'une fine gaine de tissu conjonctif appelée endomysium. Plusieurs fibres et leur endomysium sont enveloppés à leur tour d'une membrane fibreuse plus épaisse appelée périnysium pour constituer un ensemble de fibres appelé faisceau (Figure 3). De nombreux faisceaux sont regroupés dans un revêtement encore plus résistant de tissu conjonctif appelé épimysium, qui enveloppe l'ensemble du muscle (Cretoiu et al., 2018).

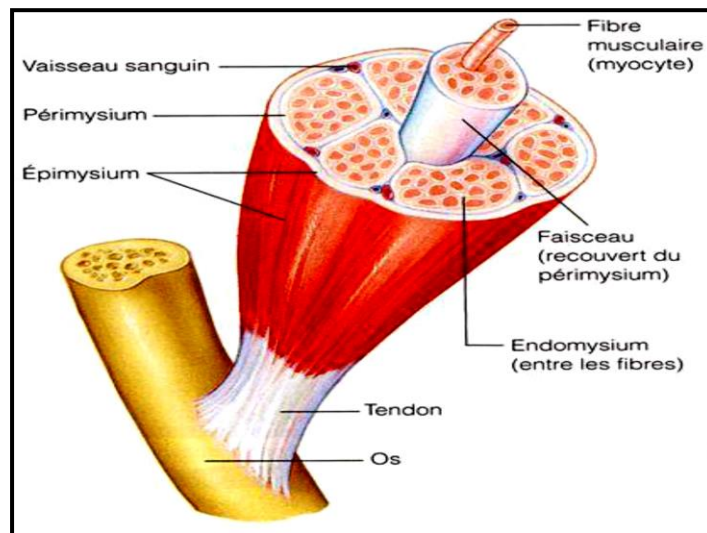


Figure 3 : Enveloppes de tissu conjonctif d'un muscle squelettique (Ostrovidov et al., 2014).

1.3.1. Cellules satellites

Les cellules satellites sont des cellules souches adultes spécifiques aux tissus (cellules souches musculaires) trouvées dans le muscle squelettique autour des fibres musculaires sous la lame basale. La membrane cellulaire de ces cellules est juxtaposée à la membrane plasmique de la myofibre. L'importance de ces cellules ayant une capacité de s'autorenouveler et de se différencier est déjà évidente au cours du développement embryonnaire du muscle, lorsque la population résidente majeure est représentée par les cellules progénitrices myogéniques Pax3+/Pax7+ (Piga et al., 2019).

1.3.2. Dégénérescence et régénérescence du muscle strié

Une des particularités du muscle strié est l'absence de mitose dans les fibres musculaires. Leurs noyaux ne sont donc pas sujets au raccourcissement des télomères lié ordinairement à la sénescence. Malgré cela, le tissu musculaire squelettique possède une grande capacité de régénération face aux dommages qui lui sont portés et cela grâce aux cellules satellites. Suite à l'activation d'une cellule satellite, elle se divise de façon asymétrique ; donnant d'une part une cellule Pax7+, MyoD+, Myf5+ qui contribuera à la réparation du muscle et d'autre part une autre cellule exprimant seulement Pax7 qui retournera en quiescence afin de maintenir le pool des cellules satellites (Figure 4) (Pichvant, 2010).

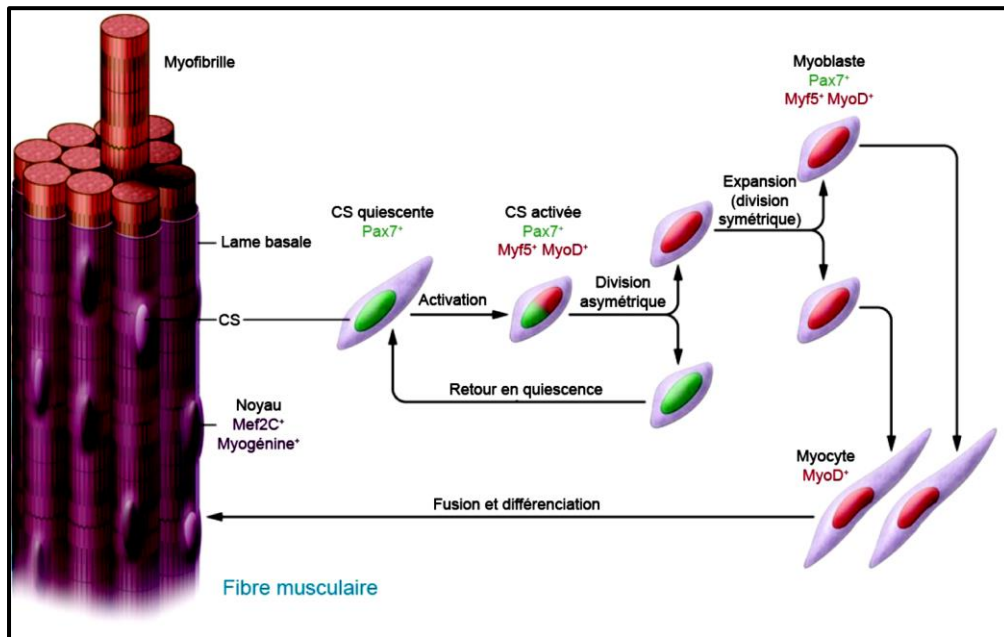


Figure 4 : Différenciation asymétrique d'une cellule satellite (Pichvant, 2010).

1.3.3. Anatomie macroscopique d'un muscle squelettique

Chaque myofibre contient de longs bâtonnets cylindriques minces, appelés myofibrilles, généralement de 1 à 2 μm de diamètre, qui s'étendent parallèlement au grand axe de la fibre musculaire. Chaque myofibrille est composée d'une chaîne d'unités contractiles répétitives le sarcomère. Sur la longueur de chaque myofibrille, il existe une alternance de bandes foncées (bandes A) et claires (bandes I). Chaque bande A est coupée en son milieu par une rayure claire (zone H). Au milieu de la bande I, se trouve une zone plus foncée (strie Z). Le sarcomère est l'unité contractile, constituée de myofilaments et de protéines contractiles. Ils sont de deux types (minces et épais); les filaments épais renferment un assemblage parallèle de molécules myosine, les filaments minces renferment des molécules d'actine ainsi que d'autres protéines. Le raccourcissement du muscle est assuré par le glissement des filaments minces le long des filaments épais et des filaments élastiques maintiennent l'organisation de la strie A et rendent possible le retour à la longueur de repos après l'étirement (Figure 5) (AFM, 2003 ; Marieb, 2005 ; Cretoiu et al., 2018).

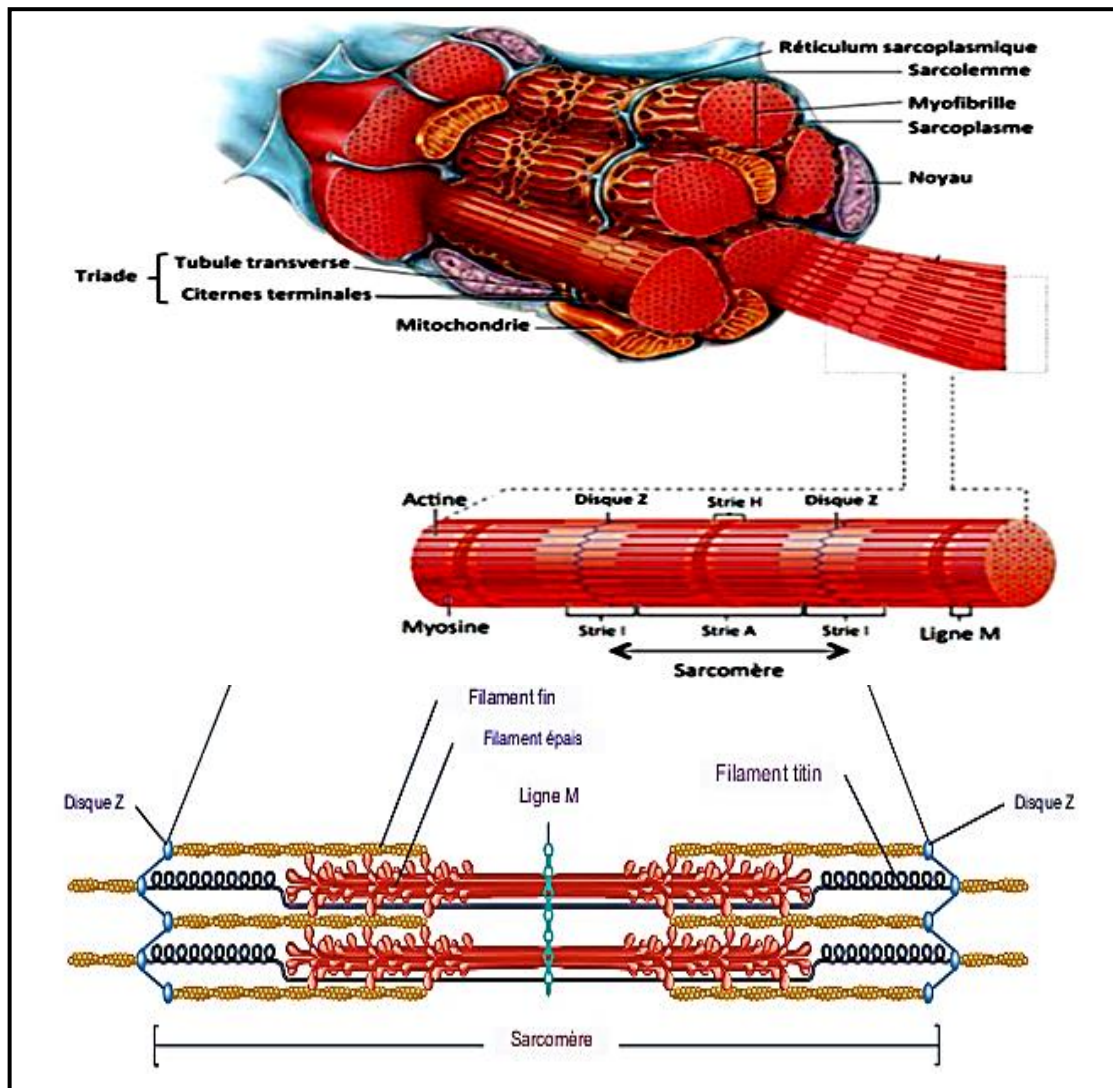


Figure 5 : Organisation subcellulaire du muscle strié squelettique (Tortora et al., 2009 ; Wattin, 2017).

I.3.4. Organisation cellulaire

Contrairement aux autres cellules de l'organisme, la myofibre possède plusieurs noyaux (plurinucléés) jusqu'à 100 à 200 noyaux disposés en périphérie de la cellule et représente la plus grande cellule du corps. Elle résulte de la fusion de cellules à un seul noyau qui sont les myoblastes (au cours du développement embryonnaire) ou les cellules satellites (au cours de la régénération après la naissance). Les myofibrilles occupent la majeure partie de l'espace intracellulaire. En conséquence, les organites cellulaires, comme les mitochondries et les noyaux, sont poussés à la périphérie du sarcoplasme (AFM, 2003 ; Cretoiu et al., 2018).

Le cytoplasme de la fibre musculaire, appelé sarcoplasme, contient les organites responsables de son fonctionnement (réticulum endoplasmique, mitochondries, ...) et le cytosquelette. Dans le sarcoplasme, se trouvent des réserves importantes de glycogène, ainsi que

la myoglobine. La fibre musculaire possède un réticulum sarcoplasmique (RS) lisse particulièrement développé. Celui-ci forme des expansions de telle sorte que deux sacs de réticulum sarcoplasmique entourent chaque tubule T pour former une triade. La triade est la structure qui permet le passage du signal nerveux (potentiel d'action) et la libération du calcium à partir du RS, c'est-à-dire le couplage de l'excitation à la contraction (AFM, 2003).

Le muscle est une véritable usine métabolique consommant de l'énergie. Le sarcoplasme d'une fibre musculaire contient de très nombreuses mitochondries. Ce sont elles qui produisent de l'énergie (ATP) directement utilisable par la fibre musculaire pour contracter ses myofibrilles (Figure 5) (AFM, 2003).

I.4. Fonction des muscles

Les muscles de notre organisme exercent quatre fonctions importantes : ils produisent le mouvement, maintiennent la posture, stabilisent les articulations et produisent de la chaleur.

Presque tous les mouvements du corps humain et de ses parties sont dus à des contractions musculaires. Les muscles squelettiques assurent la locomotion et la manipulation. Ils permettent de réagir rapidement aux événements qui surviennent dans l'environnement. La circulation sanguine est assurée par le battement régulier du muscle cardiaque et par le travail des muscles lisses présents dans les parois des vaisseaux sanguins. Le fonctionnement des muscles squelettiques détermine notre posture atteint rarement le seuil de la conscience. Hormis durant notre sommeil, leur action est constante, ils stabilisent et renforcent les articulations de squelette. Enfin, il y a perte d'énergie sous forme de chaleur pendant les contractions musculaires, cette chaleur revêt une importance vitale parce qu'elle maintient l'organisme à une température adéquate (Marieb, 2005 ; Tortora et al., 2009).

I.5. Contraction et excitation musculaire

Le couplage excitation-contraction est la coordination de deux processus nécessaires à la génération de force. Lorsque le sarcolemme est dépolarisé, un potentiel d'action (PA) est généré et déclenche la contraction des cellules musculaires. Le PA initié à la surface de la membrane couvrant toute la surface puis pénétrant profondément dans la cellule via le tubule T. Grâce à ces tubules, le PA peut se propager uniformément et rapidement le long de la cellule musculaire. Lorsqu'il atteint la membrane du réticulum sarcoplasmique, il le rend perméable aux ions calcium (Cretoiu et al., 2018). Une sous unité de capteur de tension des récepteurs à la dihydropyridine sur le tubule T s'ouvre et permet un courant entrant de calcium. Ce courant

calcique déclenche l'ouverture des récepteurs de la ryanodine (RyR) dans les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique et libère de grandes quantités de calcium dans le sarcoplasme. Le calcium libéré dans le sarcoplasme se lie alors à la protéine régulatrice troponine C sur le myofilament mince d'actine. Cela déclenche une série d'événements moléculaires qui déplacent la tropomyosine bloquant le site actif du filament d'actine (**Frontera et al., 2015**). La tête de myosine va ainsi pouvoir se lier à l'actine. Le relargage de l'ADP et du Pi présents sur la tête de myosine va initier le mouvement de contraction en entraînant une rotation de la tête de myosine, ce qui va permettre un mouvement de l'actine vers la strie M. L'ATP va ensuite se lier à son site de liaison sur la myosine, qui va alors se détacher de l'actine. La tête de myosine, par une réaction de déphosphorylation de l'ATP en ADP+Pi va alors se tourner de nouveau et ainsi se fixer à la molécule suivante d'actine. Le mécanisme de contraction prend fin avec la relaxation, qui intervient grâce au rétablissement de la concentration calcique initiale dans le cytosol. Ceci est effectué grâce aux pompes Ca^{+2} -ATPases situées sur la membrane du réticulum sarcoplasmique et qui vont pomper le Ca^{+2} dans la lumière du réticulum où il sera de nouveau stocké (**Figure 6**) (**Guilbaud, 2018**).

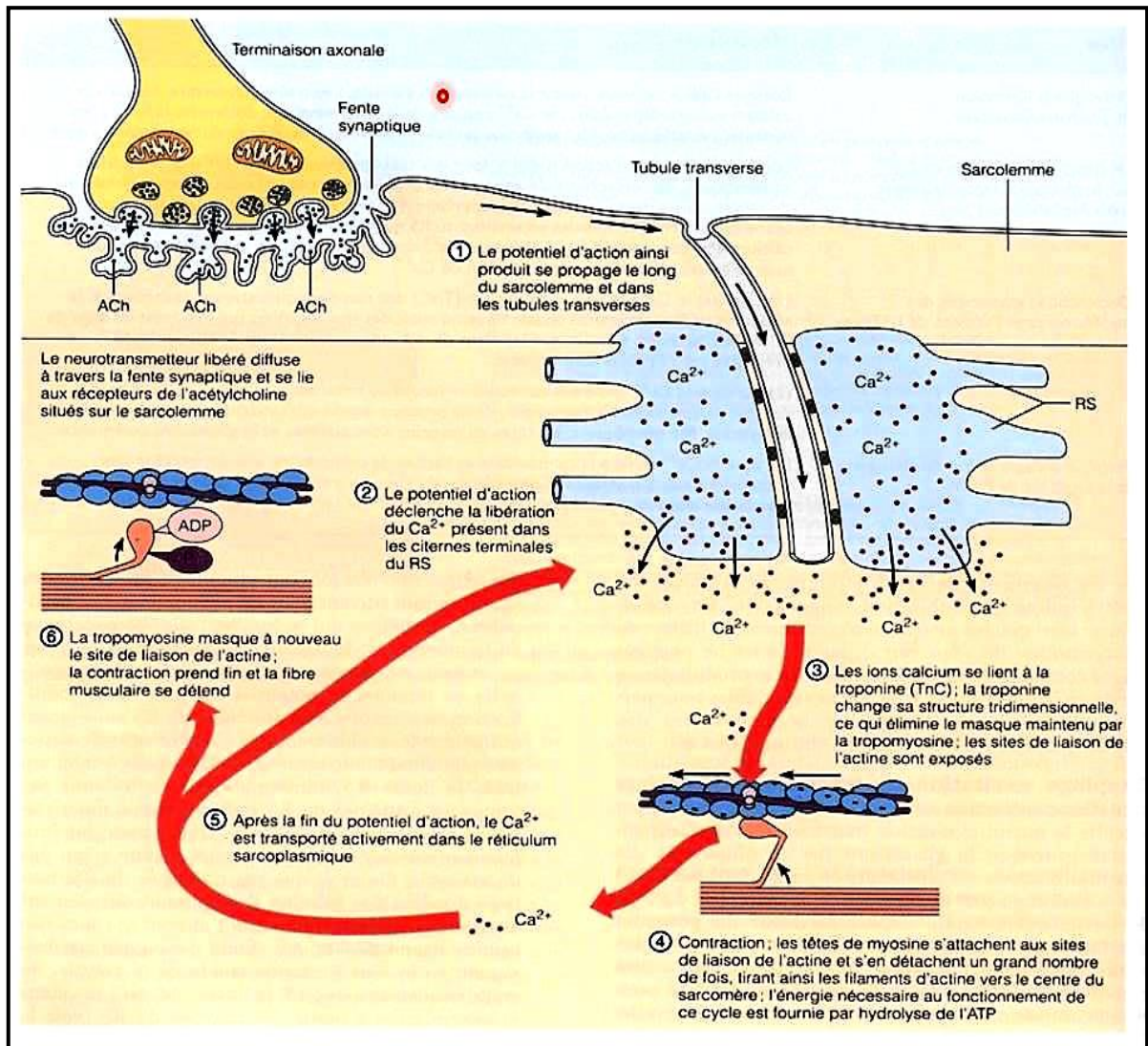


Figure 6 : Libération du calcium et couplage excitation-contraction (Marieb, 2005).

Chapitre II
Dystrophine

II.1. Gène de la dystrophine

Le gène responsable de la DMD est localisé sur le bras court du chromosome X en Xp21.1. La taille de ce gène est de 2.4 Mb, soit 90 fois plus grand que la taille moyenne d'un gène normal. Il est composé de 79 exons codant pour un ARN messager (ARNm) de 14 kb, la partie codante couvrant donc seulement 0.6 % du gène. La traduction de cet ARNm donne une grosse protéine de 3685 acides aminés. Ce gène permet la synthèse de 7 isoformes principales de la dystrophine, de tailles différentes, grâce à la présence de 7 promoteurs tissus-spécifiques (**Figure7**) (Passarge, 2008 ; Pichavant, 2010 ; Ben Yaou et al., 2016).

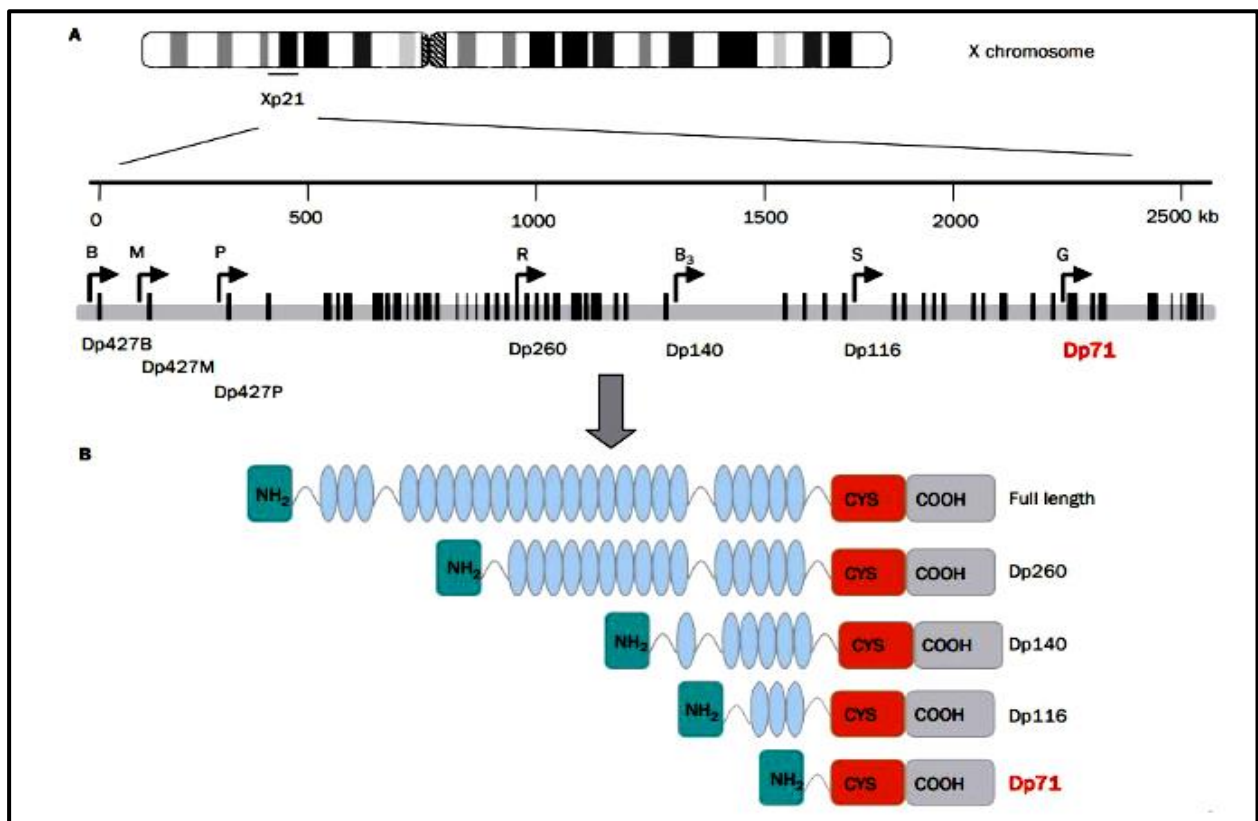


Figure 7 : Organisation génomique du gène de la dystrophine et les différents isoformes (Muntoni et al., 2003).

A : Les lignes verticales noires représentent les 79 exons du gène de la dystrophine. Les flèches indiquent les différents promoteurs : il s'agit notamment des promoteurs cérébral (B), musculaire (M) et Purkinje (P) ; R, B₃, S et G représentent les promoteurs Dp260 (rétinien), Dp140 (cerveau3), Dp116 (cellules de Schwann) et Dp71 (général).

B : Les différents domaines

II.2. Dystrophine

La dystrophine est une des protéines les plus grandes de l'organisme jusqu'ici identifiées. Elle est le plus grand membre de la superfamille des spectrines, elle est composée de 3685 acides aminés d'une masse moléculaire de 427 kDa, localisée sous le sarcolemme des fibres musculaires et constituée de quatre domaines fonctionnels. Le domaine N-terminal ou domaine de liaison à l'actine (Actin Binding Domain ou ABD1), comprenant les premiers 246 acides aminés. En plus de sa liaison à l'actine, ce domaine lie également les kératines 19 et 8. Le domaine central (ou rod domain) va de l'acide aminé 247 au 3045. Il est composé de 24 unités répétitives similaires aux répétitions en triple hélice de la spectrine. Le domaine riche en Cys, va de l'acide aminé 3080 à 3360, codé par les exons 62 à 69, composé d'un domaine WW, de deux domaines EF et d'un domaine ZZ. Ce dernier se lie au partenaire le plus important de la dystrophine, à savoir la protéine membranaire β -dystroglycane et à plusieurs autres protéines telles que la plectine, l'ankyrine et la protéine de filament intermédiaire synemine. Un domaine C-terminal va de l'acide aminé 3361 à 3685, contient les sites de fixation de syntrophine et peut moduler l'interaction entre la syntrophine et d'autres protéines associées (**Figure 8**) (Blake et al., 2002 ; Fernandez et al., 2010 ; Le Rumeur, 2015 ; Péréon et al., 2015 et Ben Yaou et al., 2016).

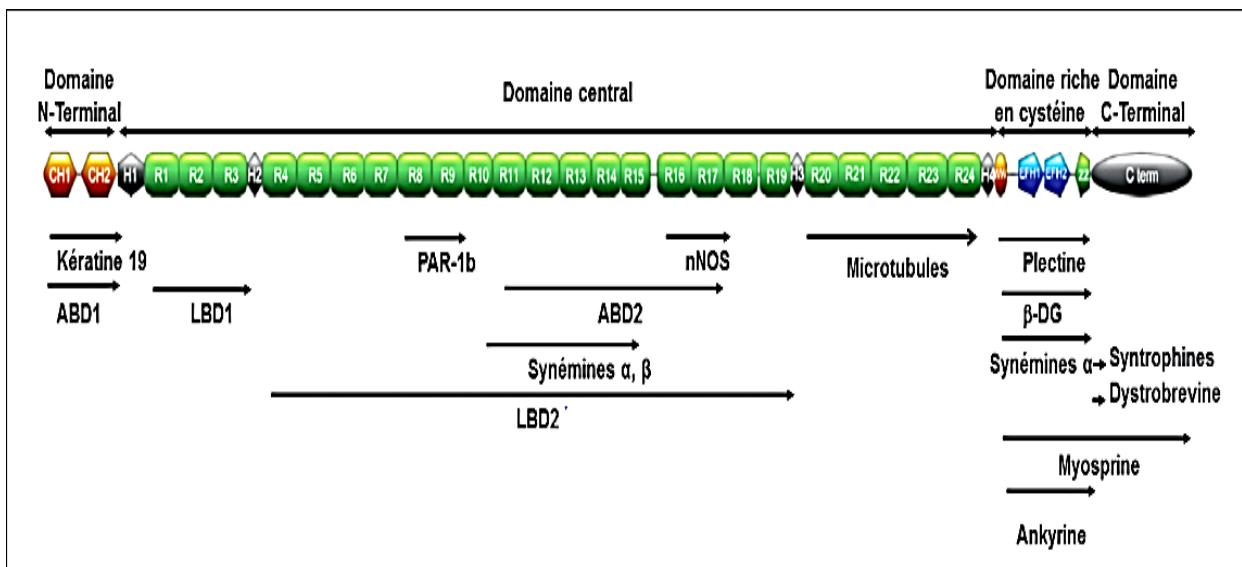


Figure 8 : Structure de la dystrophine (Ben Yaou et al., 2016).

II.3. Complexe protéique associé à la dystrophine

Les protéines associées à la dystrophine, peuvent être divisées en trois groupes en fonction de leur localisation cellulaire : extracellulaire (α -dystroglycane), transmembranaire

(β -dystroglycane, sarcoglycanes et sarcospan) et cytoplasmique (dystrophine, dystrobrevine, syntrophines et monoxyde d'azote synthase neuronale) (**Figure 9**) (**Gao et al., 2015**).

- La dystrophine située sous le sarcolemme, fait partie d'un large complexe de protéines et de glycoprotéines qui forment un pont entre le cytosquelette (filaments d'actine) et la matrice extracellulaire (**Figure 9**) (**Gillis, 2004**).
- Les dystroglycanes sont transcrits à partir d'un gène (DAG1) et sont modifiés après la traduction pour donner une sous-unité transmembranaire (bêta) et une sous unité extracellulaire (alpha) fortement glycosylée, formant le noyau du complexe protéique associée à la dystrophine. Ces dystroglycanes se lient au domaine riche en cystéine de la dystrophine, elles assurent le lien entre le cytosquelette d'actine intracellulaire et la matrice extracellulaire. Ils interagissent avec la laminine qui s'attache aux fibres de collagène de la matrice extracellulaire (**Figure 9**) (**Gillis, 2004 ; Sinnreich, 2010**).
- Les sarcoglycanes sont une famille de six protéines transmembranaires (alpha, bêta, gamma, delta, epsilon et zêta). Elles forment des complexes hétéro-tétramères qui sont composés de manière spécifique au tissu et sont censés stabiliser le complexe des protéiques associées à la dystrophine avec le sarcospane (**Figure 9**) (**Sinnreich, 2010**).
- Le Sarcospane est un composant transmembranaire intégral du complexe glycoprotéine associée à la dystrophine. Il fait également partie du complexe utrophine-glycoprotéine (UGC) qui assure la jonction neuromusculaire. Il est préférentiellement associé aux sarcoglycanes, cette association est nécessaire à l'expression stable du sarcospane au niveau du sarcolemme (**Figure 9**) (**Gao et al., 2015**).
- La dystrobrevine est une protéine apparentée à la dystrophine qui s'hétérodimérise avec la dystrophine par le biais de motifs enroulés. L'interaction sarcoglycane-dystrobrevine-dystrophine maintient en outre le complexe ensemble (**Figure 9**) (**Gao et al., 2015**).
- Les Syntrophines existent en trois isoformes de 58 kDa, se trouvent à la jonction neuromusculaire du muscle squelettique, mais seules les isoformes $\alpha 1$ et $\beta 1$ sont présents le long du sarcolemme (**Figure 9**) (**Ehmsen et al., 2002**).
- Oxyde nitrique synthase neuronale (nNOS) produit la molécule de signalisation librement diffusible oxyde nitrique (NO). Le NO peut agir comme un vasodilatateur dans l'exercice musculaire où il peut atténuer la réponse vasoconstrictrice à l'activation sympathique réflexe. La nNOS est présente principalement dans les fibres à contraction rapide où on pense qu'elle est responsable du maintien d'un apport sanguin adéquat pendant l'exercice (**Figure 9**) (**Sinnreich, 2010**). Une mauvaise localisation de la nNOS a été observée dans de nombreux types de

dystrophies musculaires, entraînant une surcontraction des vaisseaux sanguins et des lésions focales (Gao et al., 2015).

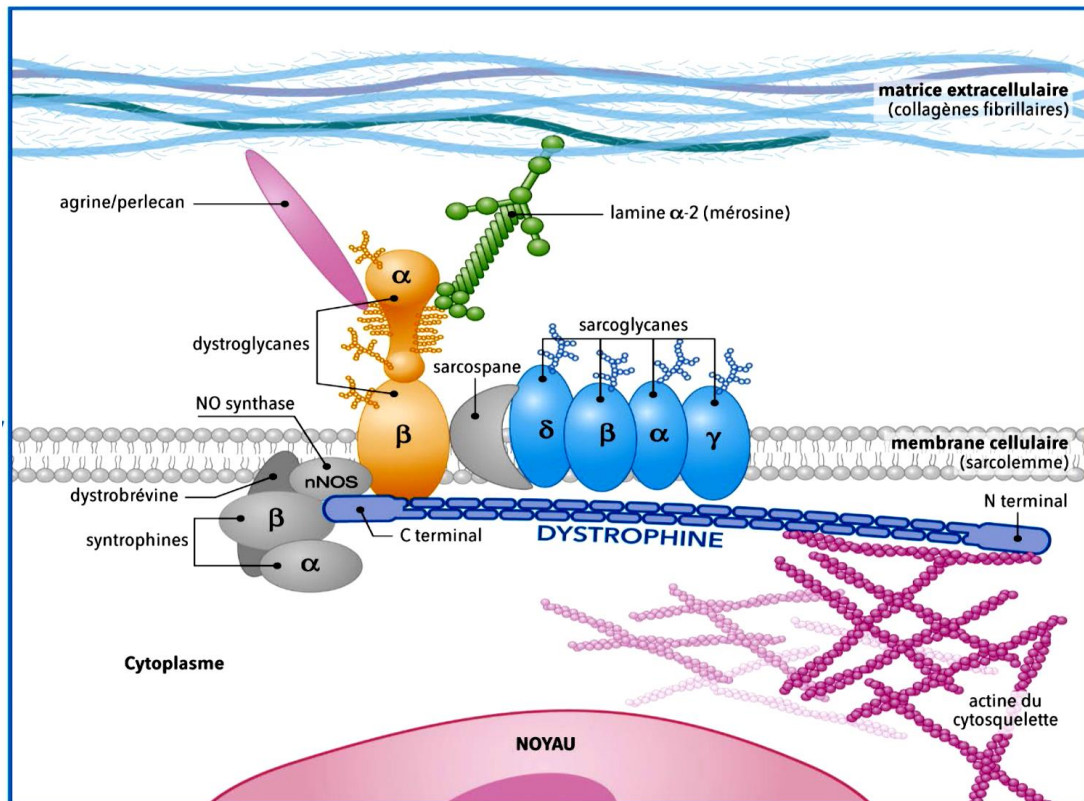


Figure 9 : Illustration du complexe dystrophine – glycoprotéines où la dystrophine est en couleur « pêche » (AFM Téléthon, 2021).

II.3. Rôle de la dystrophine

La fonction de la dystrophine découle de sa structure. Il existe deux rôles principaux :

Un rôle mécano-protecteur: vise à rattacher l'actine au complexe membranaire de la dystrophine, elle se lie avec la β -dystroglycane pour former un pont entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire et protège les fibres musculaires contre les dommages entraînés par la contraction musculaire et donc de contribuer au maintien de l'intégrité structurale de la fibre musculaire, par ses interactions avec le cytosquelette et le complexe protéique associé à la dystrophine (Fernandez et al., 2010 ; Péréon et al., 2015).

Un rôle mécano-transducteur : le DGC (Dystrophin Glycoprotein Complex) est également impliqué dans la signalisation cellulaire via l'interaction de plusieurs composants, notamment la dystrophine, avec des protéines de signalisation telles que l'oxyde nitrique synthétase neuronale (Le Rumeur et al., 2010).

Chapitre III

Dystrophies musculaires de Duchenne et Becker

Les dystrophies musculaires sont des troubles myogéniques héréditaires caractérisés par une atrophie musculaire progressive et une faiblesse de distribution et de sévérité variables. Elles peuvent être subdivisées en plusieurs groupes, dont les formes congénitales, selon la répartition de la faiblesse musculaire prédominante (**Tableau 1**) (**Emery, 2002**).

La dystrophie musculaire de Duchenne et la dystrophie musculaire de Becker sont les formes les plus évolutives, causées par des mutations du gène DMD qui code pour la dystrophine. Ils sont transmis selon le mode récessif lié au chromosome X. La sévérité du phénotype peut être corrélée au génotype dans plus de 90 % des cas (**Leturcq et al., 2018**).

Tableau 1 : Locus géniques et défauts protéiques dans les formes les plus courantes de dystrophie musculaire (**Emery, 2002**).

Désordre	Locus génique	Défaut protéique
Congénital (AR)	6q	Laminine 2 (mérosine)
Duchenne et Becker (RX)	Xp21	Dystrophine
Emery Dreifuss (RX)	Xq28	Émerin
Emery-Dreifuss (AD/AR)	1q	Lamin
A/C Distal (AR)	2p	p Dysferline
Facioscapulohumérale (AD)	4q	?
Oculopharyngien (AD)	14q	Protéine de liaison poly (A)

Modes de transmission : AR = autosomique récessif ; AD = autosomique dominant ; XR = récessif lié à l'X.
?=inconnu.

III.1. Historique

En 1851, la dystrophie musculaire progressive décrite par Edward Meryon. Puis par Duchenne de Boulogne en 1868 et en 1955, une autre forme plus tardive et évoluant plus lentement, individualisée par Becker c'est la dystrophie musculaire de Becker (**Rivier et al., 2010**).

A l'aube des années 1980, la savoir sur la maladie de Duchenne et de Becker se limitait à une bonne connaissance de la symptomatologie clinique et à la notion d'une hérédité récessive liée au sexe : seuls les garçons sont atteints, les mères transmettrices sont asymptomatiques mais ont dans deux tiers des cas une élévation de la créatine kinase plasmatique (**Chelly et al., 1988**). L'histoire de la dystrophine connaît un rebondissement majeur à la fin des années 1980 lorsque Monaco et Hoffman identifient en Xp21, par clonage positionnel, le gène impliqué dans cette affection. L'identification du gène leur permet de remonter vers la protéine. Jusqu'en 1987, le diagnostic de DMD et de BMD reposait sur des arguments cliniques, l'élévation des enzymes musculaires et la présence de signe de dystrophie sur l'analyse histologique d'une biopsie musculaire squelettique. Dès 1989, Campbell et son équipe montrent par immunohistochimie que la dystrophine se localise au niveau de la membrane des fibres musculaires et qu'elle est

étroitement liée à un complexe glycoprotéique sarcolemmique dont les composantes seront identifiées dans les années qui suivent (**Fernandez et al., 2010**).

Les avancées des connaissances en génétique permettent de réaliser, dès l'année 2000, un premier essai de thérapie génique menée par l'équipe du Pr Michel Fardeau, il consiste à évaluer l'injection, dans un muscle de l'avant-bras, du gène de la dystrophine chez neuf jeunes hommes atteints de dystrophie musculaire de Duchenne ou de Becker. En parallèle, les chercheurs explorent d'autres voies pour traiter la cause de la maladie. À agir sur ses ARN messagers afin de rétablir la fabrication d'une forme de dystrophine. C'est le cas de la translecture du codon stop, une approche qui a donné naissance à l'ataluren (Translarna®), le premier médicament spécifique de la myopathie de Duchenne à avoir reçu une autorisation de mise sur le marché en juillet 2014 (**AFM Téléthon, 2020**).

III.2. Mode de transmission de la maladie

Une anomalie génétique portée par le chromosome X peut être transmise à la descendance par la mère ou par le père.

La transmission par la mère apparaît lorsqu'une femme a une anomalie génétique dans un des deux exemplaires du gène DMD a un risque sur deux que sa descendance reçoive à son tour l'exemplaire anormal (l'allèle muté), c'est-à-dire pour chaque grossesse de fœtus masculin, le risque de donner naissance un garçon atteint de myopathie de Duchenne est de 1 sur 2 (50%), s'il s'agit d'une fille, le risque que celle-ci reçoive l'anomalie génétique est de 1 sur 2 (50%). Elle pourra alors présenter des signes de dystrophinopathie. Alors que la transmission par le père apparaît lorsqu'un homme atteint de dystrophie musculaire de Duchenne a reçu l'anomalie génétique de sa mère, elle se transmet par le chromosome X à ses filles, mais pas à ses garçons. Mais s'il s'agit d'une fille : elle a reçu de son père le chromosome X porteur de l'anomalie génétique, avec un faible risque de développer des signes de la maladie (**Figure10**) (**AFM Téléthon, 2021**).

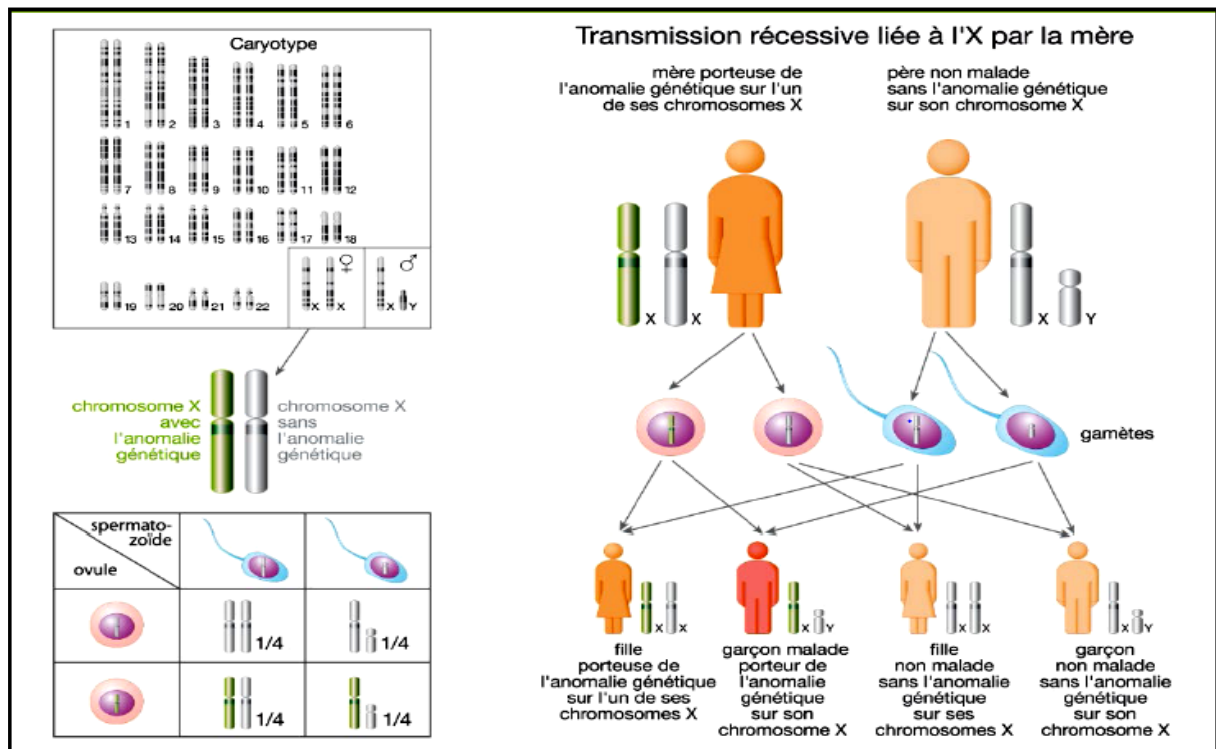


Figure 10 : Transmission récessive liée au chromosome X par la mère (AFM Téléthon, 2021).

III.3. Génétique de la maladie

La maladie est causée par des délétions intragéniques dans 65% des cas. Le point chaud le plus courant s'étend de l'exon 45 à l'exon 55, le deuxième point chaud de suppression s'étend de l'exon 3 à l'exon 19. Et par des duplications d'un ou de plusieurs exons dans 10% des cas, les plus fréquentes de l'exon 2 à 7 chez les patients DMD, plus la duplication des exons 2 à 7 chez les patients BMD (Tuffery-Giraud et al., 2009 ; Gao et al., 2015). Le reste des patients présentent des mutations ponctuelles des petites insertions ou délétions d'un ou plusieurs nucléotides dont 15 à 20 % sont des mutations non-sens, et faux-sens. Ces mutations sont responsables d'une dystrophinopathie grave de type Duchenne avec absence totale ou quasi-totale de la dystrophine, ou modérées de type Becker (Figure 11) (Ben Yaou et al., 2016 ; Lütschg, 2018).

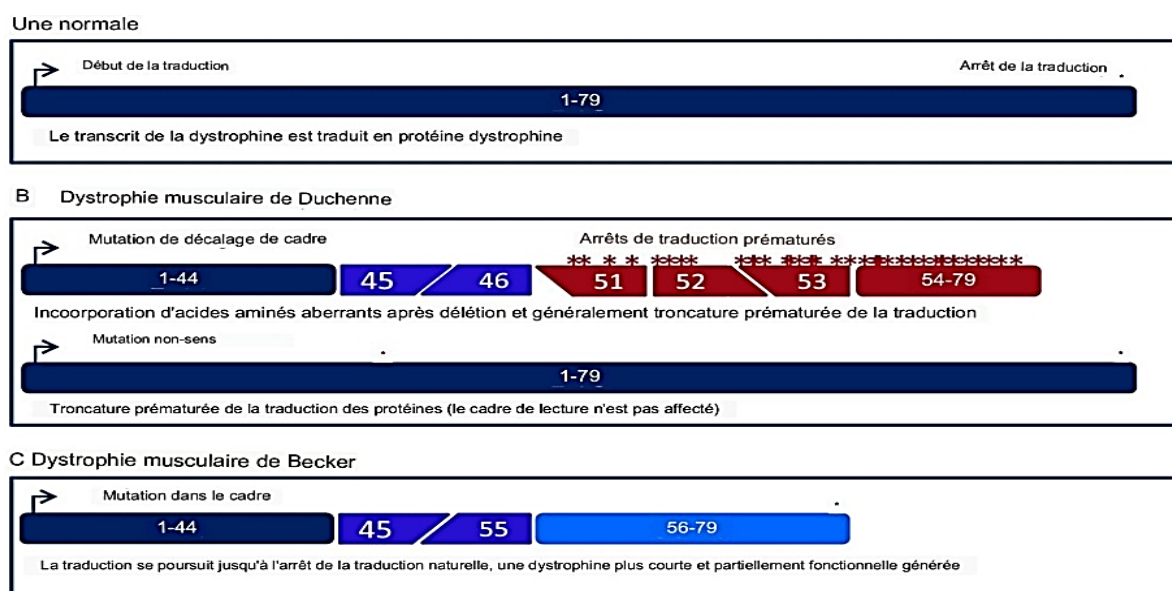


Figure 11 : Représentation schématique des transcrits de la dystrophine chez les individus sains, chez des DMD et chez des BMD (Aartsma-Rus et al., 2016).

(A) Dans la situation normale, l'ARNm de la dystrophine est constitué de 79 exons qui sont traduits en protéine dystrophine. (B) Chez les patients avec la DMD, la traduction des protéines est arrêtée prématurément. Cela peut être dû à des mutations de décalage de cadre (dans cet exemple, une suppression des exons 47–50). Alternativement, une mutation ponctuelle peut changer un codon d'acide aminé en un codon d'arrêt, (C) Chez les patients atteints de BMD, les mutations maintiennent le cadre de lecture ouvert (dans cet exemple, une délétion d'exons 46–54). Ainsi, la traduction des protéines ne s'arrête pas prématurément mais continue jusqu'au codon d'arrêt naturel à la fin de l'ARNm. Cependant, la dystrophine générée sera plus courte car il lui manquera les acides aminés codés par les exons 46–54.

III.4. Corrélation phénotype génotype DMD et BMD

Il n'y a pas de corrélation simple entre la taille de la délétion et le phénotype clinique. Par exemple, la délétion de petits exons comme l'exon 44 résulte en un phénotype sévère DMD, alors que de larges délétions pouvant atteindre 50 % du gène ont été décrites chez des patients BMD (**Figure 12**). En 1988, Monaco et al émettent une hypothèse pour expliquer les différences phénotypiques chez les patients porteurs de délétion :

Si la mutation a pour conséquence d'entraîner un codon stop prématuré dans le transcrite mature, celui-ci sera dégradé par le système de surveillance des ARN dans la cellule NMD (non sense mediated mRNA decay) et la conséquence sera une absence de production de dystrophine dans le muscle des patients conduisant à un phénotype sévère de DMD. En général, sont des mutations hors cadre telles que la suppression de l'exon 45 et la duplication de l'exon 2, et des mutations dans le cadre qui perturbent ou suppriment des domaines critiques, y compris le domaine riche en cystéine (exon 64-69), les quatre sites de liaison à l'actine (exon 2–8, 42–46) et

une grande proportion du domaine de la tige centrale (exon 9–61), des mutations non-sens largement distribuées et des petites mutations de décalage de cadre comme 372delG dans l'exon 6. En revanche, si cette mutation permet de maintenir un cadre de lecture ouvert dans le transcrit muté, la synthèse d'une dystrophine tronquée en quantité normale ou réduite assurera un phénotype moins sévère de type BMD, comme dans le cas où le patient présentant une délétion dans le cadre des exons 3 à 9, qui comprend la majeure partie du domaine N-terminal de liaison à l'actine du gène de la dystrophine, n'a montré aucun symptôme et a été diagnostiqué comme BMD à l'âge 67 ans. Cela est probablement dû à la préservation du domaine ABD (**Figure 8**) dans le domaine des bâtonnets (R11-15) pour remplir la fonction de liaison (**Le Rumeur, 2010 ; Fernandez et al., 2010 ; Ben Yaou et al., 2016 ; Sun et al., 2020**).

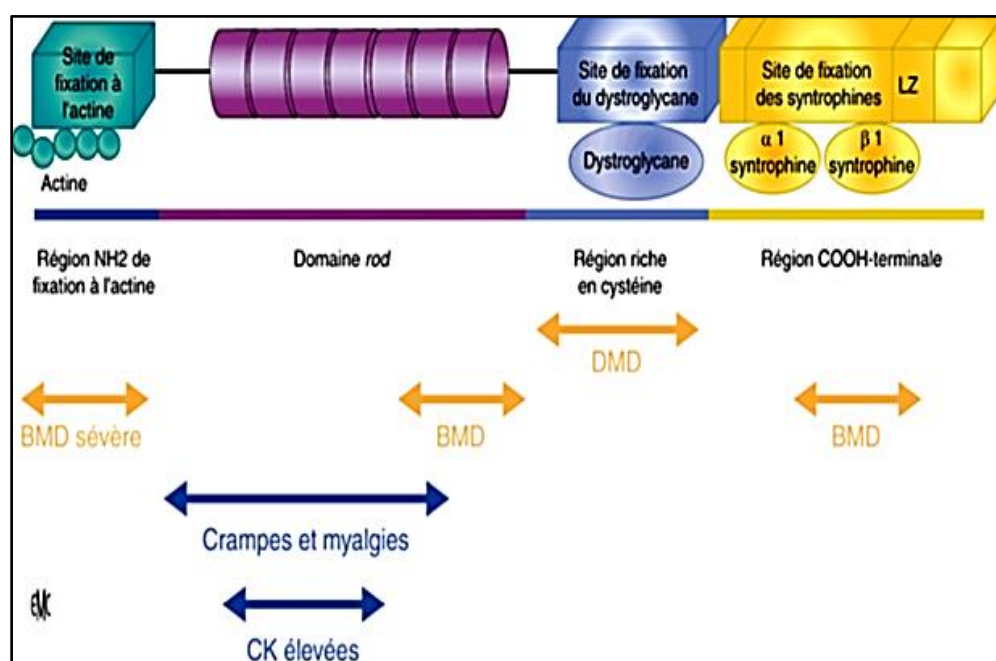


Figure 12 : Corrélation phénotype-génotype dans les dystrophinopathies (**Fernandez et al., 2010**).

III.5. Mécanisme moléculaire de l'atteinte musculaire

Alors que l'origine génétique des dystrophinopathies est parfaitement identifiée, mais les mécanismes précis qui conduisent aux processus de nécrose, d'inflammation et de fibrose musculaires observés tout au long de la maladie restent partiellement inexpliqués. Du fait de l'absence de dystrophine, la membrane devient à la fois fragile et perméable. Parmi les mécanismes qui sont impliqués dans la dystrophie musculaire :

La nécrose des fibres musculaires qui est souvent présente, elle est en rapport avec des dysfonctions vasculaires. En raison de l'inactivité prolongée la nNOS se dissocie du sarcolemme

et induise une atrophie via la voie médiée par le facteur de transcription forkhead (FoxO) et une production réduite de nitrique oxyde (NO) ce qui provoque une vasoconstriction du fait d'une réduction de la production de GMP cyclique dans les cellules musculaires lisses et des artéριοles du muscle squelettique. Elle favorise ainsi l'ischémie à l'exercice (**Fayssoil et al., 2008 ; Percival et al., 2011**).

Une inflammation chronique est habituellement constante au niveau musculaire, ce qui l'affirme l'hyperexpression des gènes impliqués dans l'inflammation et dans la réponse immunologique. Les différents stimuli de cette dernière, l'absence de dystrophine qui cause des brèches dans le sarcolemme ce qui provoque des fuites vers le milieu extracellulaire des molécules telles que les protéines de choc thermique ou acides nucléiques, ces derniers vont se fixer aux TLR pour récepteur toll like et alors l'initiation d'un processus inflammatoire (réponse immunitaire innée). Les cytokines pro-inflammatoires induisent l'expression du CMH de classe I et II dans les fibres musculaires, et stimule le recrutement de lymphocytes T et B et donc d'une réponse immune adaptative dans le muscle (**Fayssoil et al., 2008 ; Péréon et al., 2015**).

Le mécanisme le plus complexe est celui qui est impliqué dans la perturbation de l'homéostasie calcique. Dans la dystrophie musculaire de Duchenne, la perte de dystrophine déstabilise le complexe dystrophine-glycoprotéine et altère d'une part, la fonction vasorégulatrice de la nNOS, entraînant une déstabilisation de RyR, et provoque une fuite de Ca^{+2} et d'autre part, ils évoquent une surcharge mitochondriale en calcium ce qui perturbe le métabolisme énergétique cellulaire. Cette élévation des concentrations intracellulaires calciques provoque l'activation critique de plusieurs voies de signalisation, incluant la calpaïne (**Figure 13**), protéinase dépendant du calcium, qui dégrade les protéines et contribue à la mort cellulaire. Une production importante de radicaux libres ROS est observée au cours de la DMD. Elle est due à une activité plus importante de la NADPH oxydase membranaire et aux conséquences de l'élévation du calcium intracellulaire sur les mitochondries. Ils vont participer à l'activation de mécanismes d'inflammation par l'intermédiaire de la voie $NF-\kappa\beta/TNF\alpha$ (**Figure 13**) (**Péréon et al., 2015 ; Miyatake et al., 2016 et Zablocka et al., 2021**).

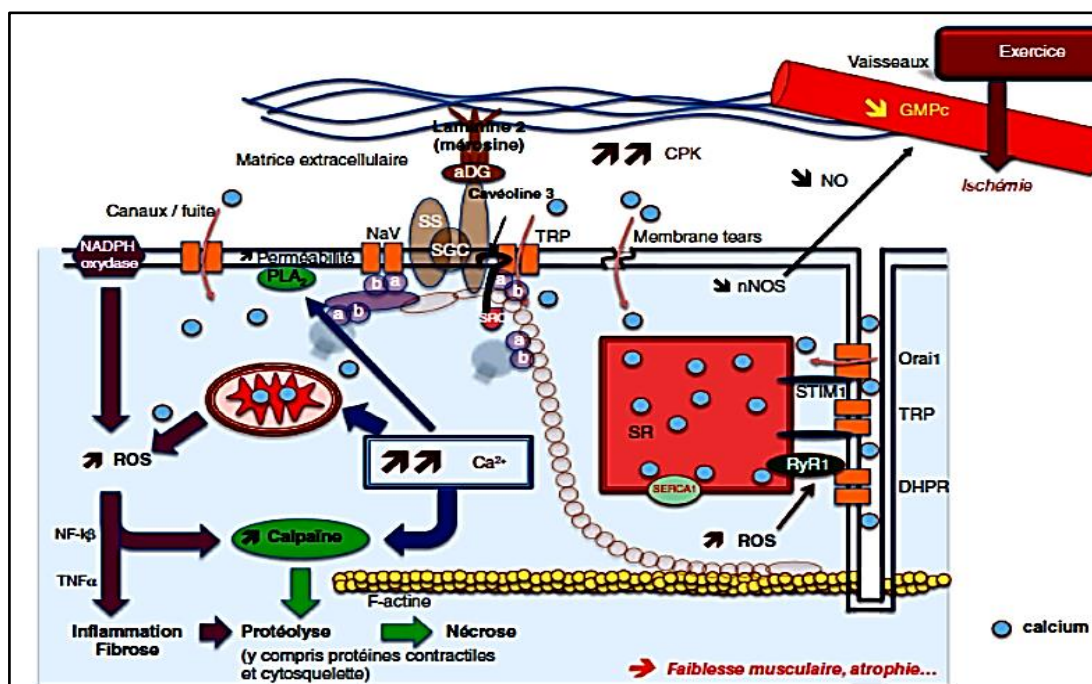


Figure 13 : Principaux mécanismes physiopathologiques (Péron et al., 2015).

III.6. Aspect cellulaire

La dystrophine s'exprime normalement dans tous les types des cellules (tous les types du muscle squelettique, du muscle cardiaque et du muscle lisse). Bien que de faibles niveaux de dystrophine (ou de son ARNm) puissent être détectés dans tous les types de tissus dystrophiques chez le patient DMD et les muscles des chiens DMD, en parallèle la perte progressive des fibres musculaires au fur et à mesure que la maladie progresse, cela peut-être en raison de l'échec progressif de la régénération des fibres musculaires. Ces muscles dystrophiques se caractérisent par le remplacement des fibres musculaires dégénérées subséquent par le tissu adipeux et fibreux (Figure 14) (Hoffman et al., 1989 ; McIntosh et al., 1998).

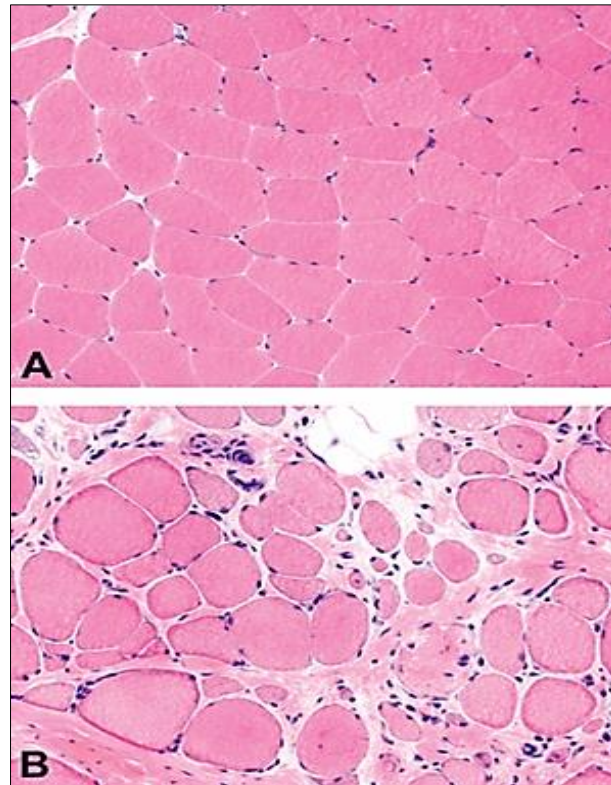


Figure 14 : Coupes histologiques du muscle normale et DMD (Wilson et al., 2017).

La section du muscle normal (A) montre des myofibres de taille uniforme, de forme polygonale et régulièrement espacées avec très peu de tissu conjonctif endomysial. (B) montre une variation accrue de la taille des myofibres (atrophie et hypertrophie), des noyaux internes, une myonécrose, une fibrose endomysiale et un remplacement graisseux. Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine.

Cette régénération précoce de courte durée due à l'incapacité des cellules satellites à régénérer efficacement le tissu musculaire demeurent incertaines. On cas de blessure d'un muscle sain induit l'activation des cellules satellites. Une certaine proportion des cellules satellites activées expriment alors la dystrophine à laquelle se lie la protéine Mark2 (microtubule affinity regulating kinase 2). Ce complexe interagit avec la protéine Pard3 (partitioning defective 3 homolog) pour induire une distribution polarisée du complexe dystrophine-Mark2 et de Pard3 à des pôles cellulaires opposés. Ce processus conduit à la division asymétrique de la cellule satellite permettant de générer un myoblaste différencié et une cellule satellite indifférenciée. Le myoblaste fusionne avec la fibre musculaire endommagée pour la restaurer alors que la cellule indifférenciée permet le maintien de la réserve de cellules satellites en cas de dommages ultérieurs. En absence de dystrophine chez les souris mdx (modèle murin de la DMD), l'expression de Mark2 est diminuée ne permet pas la polarisation de la protéine Pard3, favorise ainsi la division symétrique des cellules satellites (**Figure 15**). Ces divisions successives engendrent un grand nombre de cellules indifférenciées au détriment du nombre de myoblastes,

ce qui conduit à une altération des processus régénératifs et participe à la dégradation progressive du tissu musculaire (Brun et al., 2016).

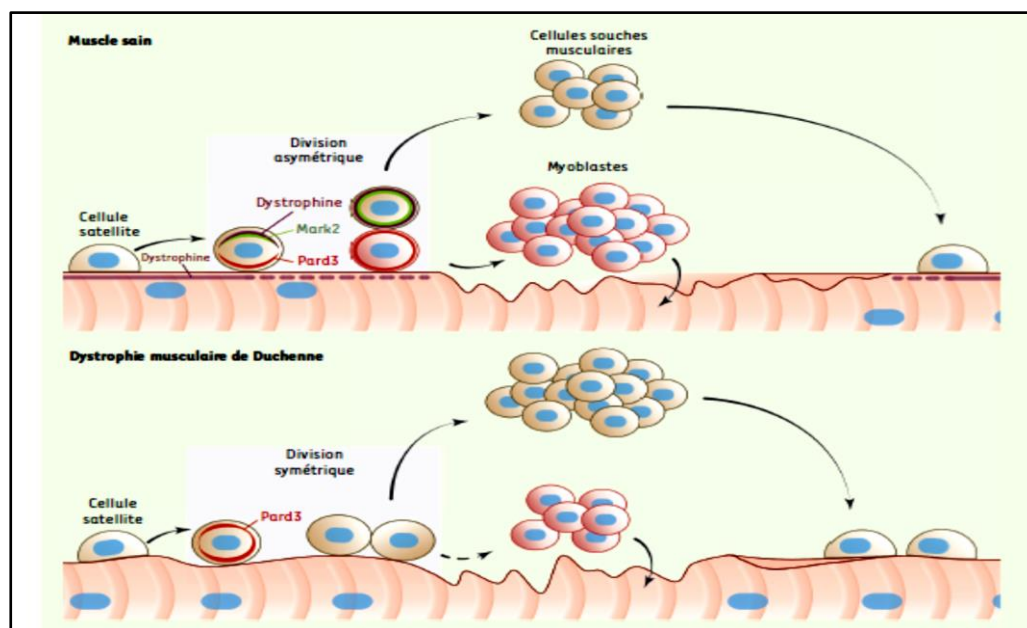


Figure 15 : Conséquences des déficits intrinsèques des cellules satellites dans la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) (Brun et al., 2016).

La régénérescence cardiaque est particulièrement difficile car, cet organe manque de cellule souches résidentes qui pourraient régénérer la population de cardiomyocytes. Dans les tissus sains, les cardiomyocytes, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses endothéliales et vasculaires sont en équilibre homéostatique (Starosta et al., 2020).

II.7. Altérations musculaires

Ces altérations suggèrent que des altérations de la régulation ionique et (ou) du métabolisme oxydatif peuvent être présentes dans la dystrophie comme suit (Figure 16) :

Il est constaté que la dystrophine et le complexe glycoprotéique peuvent moduler l'interaction entre les canaux Ca^{+2} de type L et RyR. Chez les patients DMD, le manque de la dystrophine provoque une mauvaise localisation de nNOS ce qui augmente la production de ROS, ces derniers augmentent l'ouverture du RyR, entraînant une fuite de Ca^{+2} . Le RyR devient suractivé et libère du Ca^{+2} dans le cytoplasme de manière constitutive. L'épuisement de la réserve de Ca^{+2} du réticulum sarcoplasmique favorise la translocation de STIM1 (stromal interaction molecule 1) dans la membrane du réticulum sarcoplasmique vers des régions proches de la membrane plasmique, dans laquelle STIM1 active Orai1, le rendant surexprimé, et permet l'influx de Ca^{+2} à travers la membrane plasmique dans le cytosol, ainsi les canaux calciques TRP (transient receptor potential) surexprimés sur la membrane plasmique dans la DMD induisent

une augmentation du Ca^{+2} cytosolique à partir de l'extracellulaire. Une augmentation excessive de la concentration cytosolique de Ca^{+2} dans les cellules musculaires pendant la contraction et l'absence de retour à un taux de calcium normal empêche les fibres musculaires de se détendre (Allen et al., 2016 ; Miyatake et al., 2016 et Zablocka et al., 2021).

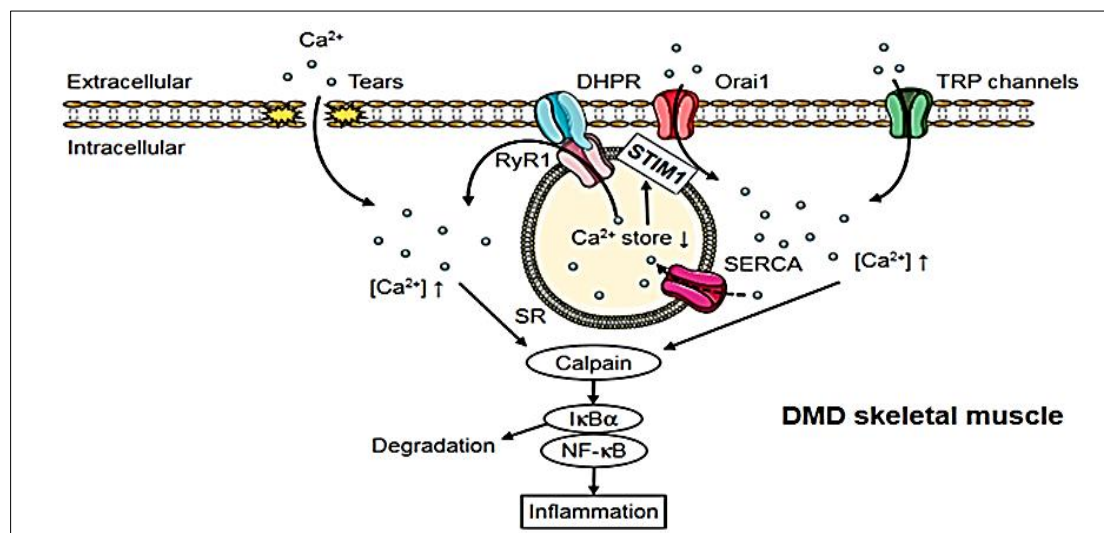


Figure 16 : Mécanisme hypothétique de la réponse inflammatoire induite par un débordement de Ca^{+2} dans les muscles DMD (Miyatake et al., 2016).

La cardiomyopathie se caractérise par une diastolique initiale et une dilatation ventriculaire. Le muscle cardiaque dépourvu de dystrophine fonctionnelle est mécaniquement faible et la contraction de la myocytes cardiaques entraîne des lésions membranaires et une cascade d'afflux accru de calcium dans la cellule et éventuellement la mort cellulaire (Kamda et al., 2016 ; Pioner et al., 2020).

La dystrophine est présente dans les muscles lisses des parois du tube digestif et des voies urinaires, ce qui explique le problème de la constipation, du reflux gastro-oesophagien et des difficultés d'uriner (envie d'uriner, perte ou rétention d'urine...) chez les patients atteints de DMD ou BMD (AFM Téléthon, 2022).

L'altération du muscle strié par la DMD, se traduit par une altération fonctionnelle simultanée au niveau des muscles respiratoires et des muscles de la statique vertébrale. Les muscles responsables des mouvements respiratoires (diaphragme, intercostaux, abdominaux...) sont aussi atteints (AFM Téléthon, 2022).

Chapitre IV

*Diagnostic des dystrophies
musculaires de Duchenne
et Becker*

IV.1. Analyse clinique et paracliniques

Dans le tableau clinique typique, les premiers symptômes de DMD ont tendance à être remarqués vers l'âge de 3 à 5 ans et comprennent généralement une faiblesse musculaire apparente (marche sur les pointes, course difficile, difficultés à monter les escaliers) et parfois précédées d'un retard à l'acquisition de la marche autonome, une hyperlourdose, une marche dandinante et des difficultés à se relever de la position allongée au sol, c'est le signe de Gower's (**Figure17**). Une pseudohypertrophie des mollets est présente dans presque tous les cas. Les muscles proximaux sont plus faibles que les muscles distaux, et les jambes plus touchées que les bras, la faiblesse apparaît en général durant l'enfance ou l'adolescence, mais peut aussi s'observer dès la vie intra-utérine (dystrophie congénitale). Ces difficultés évoluent jusqu'à la perte totale de la marche vers l'âge de 8-10 ans. Elles s'expliquent par l'atteinte de la ceinture pelvienne (**Cherin, 1995 ; Fernandez et al., 2010 ; Lütschg, 2018 et Meyers et al., 2019**).

En parallèle de cette atteinte orthopédique, la faiblesse des muscles respiratoires ainsi que l'atteinte du diaphragme provoquent une insuffisance respiratoire à évolution variable mais relativement rapide, la fonction respiratoire est en général normale jusqu'à l'âge de 10 ans puis la capacité vitale diminue progressivement. L'atteinte cardiaque est un autre élément majeur du tableau clinique et représente la première cause de décès avec les insuffisances respiratoires (20 à 40 %). Les muscles lisses sont aussi atteints amenant à des problèmes digestifs et urinaires. Ces enfants peuvent aussi avoir des difficultés d'apprentissage possible dû à la présence aussi de la dystrophine dans le cerveau, ainsi le manque de déambulation et la faiblesse des muscles paravertébraux, favorisent aussi des déformations de type scoliose chez ces enfants avec une fragilité osseuse qui s'installe petit à petit (**Dugas, 2013 ; Wahbi, 2015**).

La BMD est caractérisée sur le plan clinique par un phénotype moins sévère que la DMD, les symptômes sont d'apparition plus tardive et l'atteinte musculaire plus lentement progressive. La distinction entre DMD et BMD est basée sur l'âge de la dépendance au fauteuil roulant : avant l'âge de 13 ans pour les DMD et après 16 ans pour les BMD. On sait maintenant que certains patients BMD qui exprime la maladie après 30 ans peuvent rester ambulants jusqu'à l'âge de 60 ans.

Enfin, il existe également des BMD avec atteinte asymptomatique caractérisé par une augmentation de la créatine Kinase (CK), des myalgies, une hypertrophie des mollets, des crampes sans un véritable déficit moteur. Il n'y a pas, en général, d'atteinte cardiaque au stade précoce de la maladie bien que des tachycardies sinusales et des anomalies dans l'électrocardiogramme peuvent être identifiées l'anomalie. L'âge de début des symptômes se situe entre 30 et 65 ans (**Fernandez et al., 2010 ; Magot et al., 2015**).

Malgré l'implication plus légère des muscles squelettiques, l'insuffisance cardiaque due au dystrophie cardiomyopathie (DCM) est une cause fréquente de morbidité et la cause la plus fréquente de décès dans la BMD. L'âge moyen de décès se situe au milieu de la quarantaine. Le DCM associé à la DMD est caractérisé par une dilatation ventriculaire gauche et une insuffisance cardiaque congestive. Les femmes hétérozygotes pour une variante pathogène de la DMD présentent un risque accru de DCM (Darras et al., 2022).

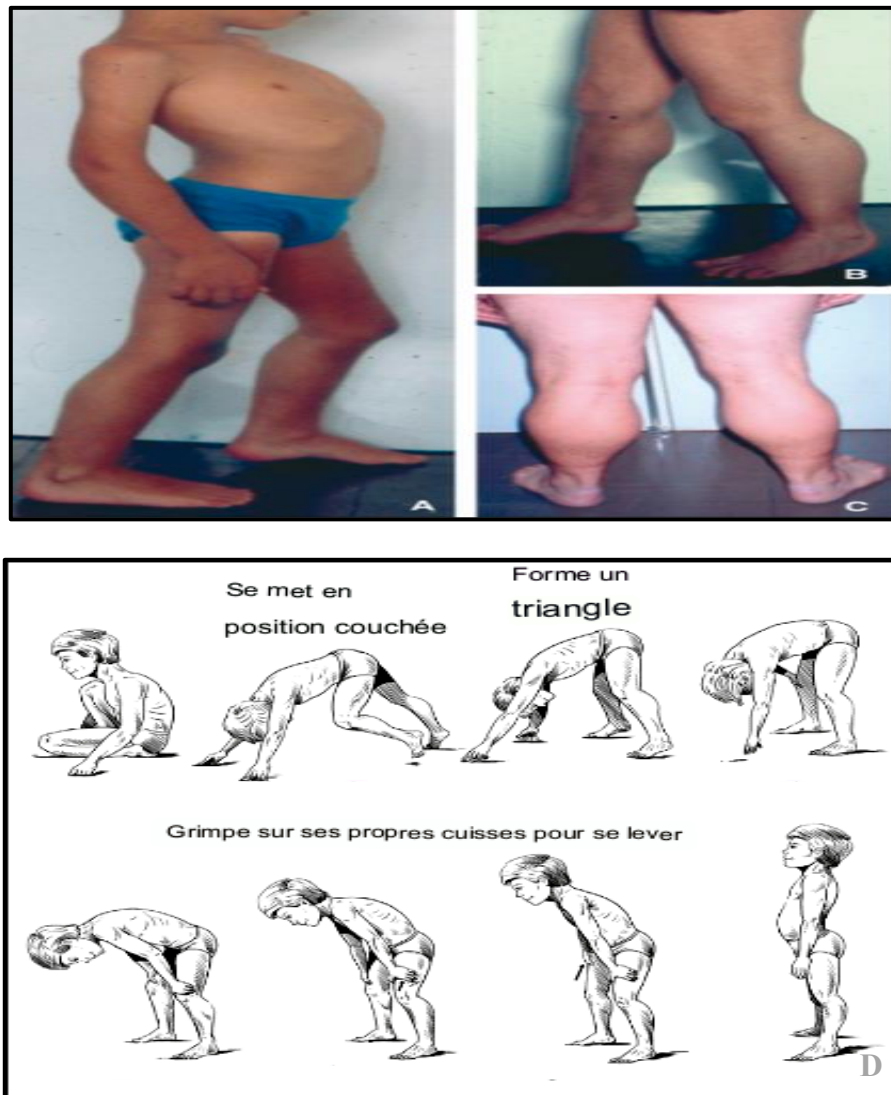


Figure 17 : Aspects cliniques. Enfant atteint de DMD (Fernandez et al., 2010 ; Epomedicine, 2018).

- A. Attitude en hyperlordose.
- B. Marche sur la pointe des pieds et légère hypertrophie des mollets.
- C. Adulte de phénotype Becker : présence d'une hypertrophie des mollets
- D. Signes de Gower's.

IV.2. Analyse biochimique

Le médecin prescrit souvent d'autres examens avant de demander une analyse du gène DMD.

IV.2.1. Dosage des enzymes musculaires

Une des premières étapes diagnostiques en présence de symptômes musculaires est de mesurer le taux sanguin de l'enzyme musculaire la créatine kinase (CK ou CPK pour créatine phospho-kinase). D'autres dosages sanguins peuvent être prescrits en même temps que le dosage des CPK, lactate déshydrogénase (LDH) et l'aldolase ou les transaminases (AFM Téléthon, 2021).

Le taux normal dans le sang de l'enzyme CPK est entre 60-140 U/l chez les femmes et entre 80-200 U/l chez l'homme, alors que chez les personnes atteints le taux de CPK varie entre 5000UI/l et 10000UI/l (Tableau 2) (iomnis, 2012 ; PNDS, 2019).

Au cours de l'évolution de la maladie la concentration sérique de CK diminue progressivement avec l'âge en raison de l'élimination progressive des fibres musculaires dystrophiques (Darras et al., 2022).

Tableau 2 : Concentration sérique de créatine phosphokinase dans les dystrophinopathies (Darras et al., 2022).

	Phénotype	%De personnes touchées	Concentration sérique de CK
Males	DMD	100 %	>10x normal
	BMD	100 %	>5x normal
	DMD associé DMC	La plupart des individus	Augmenté
Femme	DMD	~50 %	2-10 x normal
	BMD	~30%	2-10 x normal

IV.2.2. Électromyogramme

L'électromyogramme (EMG) est un examen souvent pratiqué pour explorer l'origine de difficultés motrices. Cet examen invasif consiste à enregistrer l'activité électrique de certains muscles et à mesurer la vitesse de circulation de l'influx nerveux à l'intérieur des nerfs (vitesse de conduction). L'analyse des tracés électromyographiques permet de savoir si les difficultés

motrices sont dues à une atteinte des muscles (origine myopathique ou myogène, comme dans les dystrophinopathies) ou à une atteinte des nerfs (origine neuropathique ou neurogène) (AFM Téléthon, 2021).

IV.3. Analyses histologiques, immuno-histochimiques et Western blotting

IV.3.1. Biopsie musculaire

Bien que les progrès du diagnostic moléculaire discutés plus loin ont diminué le rôle de la biopsie musculaire dans le diagnostic de la DMD et de la BMD (Flanigan et al., 2014).

La biopsie musculaire a montré une importante inégalité de la taille des fibres avec présence de fibres atrophiques et de fibres hypertrophiques d'aspect arrondi, ainsi que des centralisations nucléaires avec présence de foyers inflammatoires permet d'évaluer la quantité résiduelle de la dystrophine (Fernandez et al., 2010 ; Mzabi et al., 2022).

Le complexe protéique et la dystrophine sont explorés par deux méthodes distinctes complémentaires :

Le marquage immuno-histochimique sur des coupes congelées effectuées transversalement pour bien visualiser la taille des fibres et le sarcolemme, avec l'utilisation de trois anticorps dirigés contre les parties N-terminale (DYS 3), centrale (DYS 1) et C-terminale (DYS 2) de la dystrophine. Puis l'analyse spécifique des protéines dans un extrait musculaire total en milieu dénaturant suivi d'électrophorèse, puis d'un transfert sur membrane des protéines séparées en fonction de leur poids moléculaire, et finalement repérées par immunomarquage. Une seule bande à 427 kDa est détectée avec l'anticorps DYS 2 et un doublé de 400 et 427 kDa est détecté avec l'anticorps DYS 1 (Western blot) (Figure18) (Leturcq et al., 2000 ; Fernandez et al., 2010).

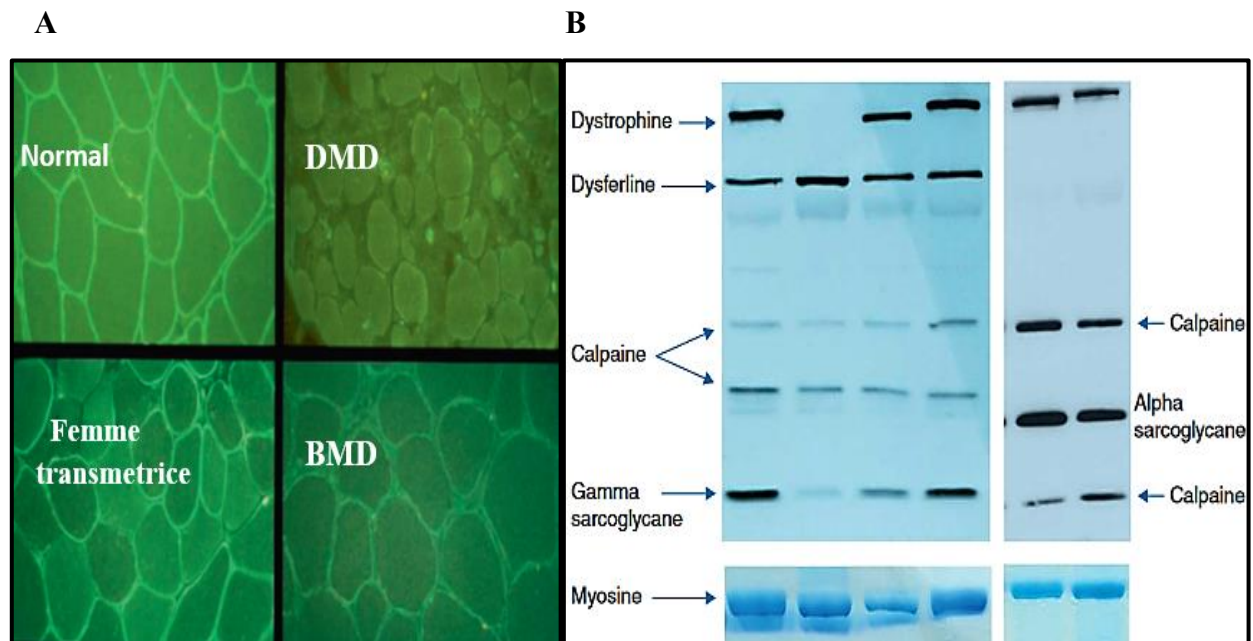


Figure 18 : Étude des protéines à partir de la biopsie musculaire (Leturcq et al., 2015).

A : par immunofluorescence : marquage de la dystrophine avec un anticorps monoclonal **B** : par immunotransfert (Western blot). Un mélange d'anticorps monoclonaux est utilisé de façon à révéler simultanément la dystrophine, la dysferline, la calpaine 3 et l'alpha et gamma-sarcoglycane). (1, 4, 5) muscle normal (contrôle), (2) patient DMD montrant une absence de dystrophine. A noter la diminution secondaire de la gamma-sarcoglycane, (3) patient BMD montrant une dystrophine de taille diminuée mais en quantité quasi normale correspondant à une délétion en phase, (6) patient BMD montrant une dystrophine de taille augmentée correspondant à une duplication en phase.

IV.3.2. Imagerie musculaire

Lorsqu'il n'y a pas d'antécédent familial de dystrophie musculaire de Duchenne ou de Becker, l'imagerie musculaire peut avoir un intérêt, surtout pour différencier une dystrophinopathie d'une autre dystrophie musculaire.

Dans la DMD, la dégénérescence graisseuse du muscle se fait lentement sans phénomènes œdémateux initiaux importants. Le muscle est remplacé progressivement par la graisse et ce filling-up process s'accompagne d'une augmentation du volume musculaire (Mattei et al., 2008).

IV.4. Analyses moléculaires

Les gènes suspectés d'avoir une dystrophinopathies sur la base du diagnostic clinique sont dirigés vers une confirmation moléculaire réaliser pour montres la présence des mutations dans le gène DMD en utilisant les techniques suivantes :

IV.4.1. Multiplex Ligation-dependant Probe Amplification (MLPA)

La technique MLPA permet d'évaluer le nombre de copies pour chacun des 79 exons en utilisant des sondes standardisées mettant en évidence aussi bien les délétions que les duplications. Cette technique rapide et fiable est l'une des plus utilisée en routine pour les cas index et pour la recherche de statut des femmes à risque. Elle permet de résoudre la majorité des anomalies quantitatives du gène DMD (**Leturcq et al., 2018**).

IV.4.2. PCR Multiplex semi-quantitative

La PCR multiplex est une technique utilisée pour amplifier plusieurs fragments dans une seule réaction. Deux réactions de PCR explore simultanément les 50 exons les plus fréquemment délétés ou dupliqués situés dans la partie 5' et la partie 3' du gène permettent de répondre rapidement à environ deux tiers des cas des anomalies quantitatives, aussi bien pour les cas index que pour les femmes à risque. Cette technique, basée sur la détection de la taille du fragment amplifié, peut donc aussi révéler de petites délétions ou duplications d'une à plusieurs bases. Une amplification isolée des exons entourant la délétion mise en évidence est parfois nécessaire pour en préciser les bornes (**Leturcq et al., 2015**).

IV.4.3. Séquençage à haut débit

Séquençage massif en parallèle des 79 exons du gène DMD permet de mettre en évidence les mutations ponctuelles, les petites insertions /délétions mais aussi les défauts quantitatifs telles que les délétions ou duplications d'un ou plusieurs exons (**Leturcq et al., 2018**).

IV.4.4. Real Time-PCR (RT-PCR)

La PCR en temps réel a été spécifiquement développée pour quantifier des cibles d'ADN spécifiques grâce à la surveillance de la formation du produit. Cette technologie a été appliquée avec succès pour la détection de délétions ou de duplications hémizygotés dans différentes maladies génétiques. Récemment, un test PCR quantitatif en temps réel basé sur le colorant SYBR Green qui a été développé pour la détection des délétions/duplications du gène de la dystrophine (**Traverso et al., 2006**).

IV.4.5. Séquençage par la méthode de Sanger

Le séquençage des 79 exons par la technique « classique » après une PCR. Est une technique longue et coûteuse mais efficace, servant de technique de référence pour valider les résultats fournis par les nouvelles techniques de séquençage à haut débit (**PNDS, 2019**).

IV.4.6. Test de troncation des protéines

Le test de troncation des protéines ou PTT (PTT pour protein truncation test) a pour principe d'analyse des produits de la traduction des transcrits ARNm de la dystrophine à la recherche de mutations responsables d'un arrêt prématuré de la synthèse protéique (ce qui représente 98 % des mutations ponctuelles des DMD). La plupart des mutations identifiées jusqu'à présent chez les patients atteints de DMD sont des mutations ponctuelles non-sens ou de petites délétions ou insertions par décalage de cadre de lecture, les mutations du site d'épissage sont également assez courantes. L'avantage du test de troncation des protéines est que l'analyse des ARN messagers réduit la taille des séquences nucléotidiques nécessaires à l'analyse. De plus, comme pour d'autres études basées sur l'ARN, les tests de troncation des protéines permettent d'explorer l'effet des mutations introniques profondes (**Muntoni et al., 2003 ; Fernandez et al., 2010**).

Chapitre V
Approches
thérapeutiques

À mesure que les normes de soins pour la DMD ont évolué, la survie s'est également améliorée. Des considérations de soins actualisées ont récemment publié. Parmi les normes de soins discutées, les glucocorticoïdes oraux, la prise en charge cardiaque, la prise en charge pulmonaire, les vaccinations, la physiothérapie et les soins orthopédiques, la prise en charge nutritionnelle et la santé osseuse sont souvent mis en avant. Les objectifs de ces considérations de soins ont d'améliorer la survie à long terme, de maintenir la mobilité et l'indépendance et d'améliorer la qualité de vie globale (Shieh et al., 2018).

V.1. Thérapie classique

V.1.1. Thérapie pharmaceutique

V.1.1.1. Corticostéroïdes

Les corticostéroïdes sont les seuls agents pharmacologiques dont l'efficacité a été prouvée dans la DMD. Les premiers essais contrôlés randomisés à court terme une amélioration démontrée de la force musculaire et de la fonction respiratoire. La force musculaire s'est améliorée dans les 10 jours suivant le début des corticostéroïdes et était maximale à 3 mois et maintenue jusqu'à 18 mois. Des études ultérieures à plus long terme ont montré que les corticostéroïdes quotidiens prolonge la marche jusqu'à 3 ans, déclenche le déclin de la fonction (l'insuffisance respiratoire), déclenche le risque de scoliose progressive et détermine l'espérance de vie. Les corticostéroïdes les plus couramment utilisés sont la prednisolone et la prednisone, à une dose de 0,75 mg/kg/jour. Le déflazacort (0,9 mg/kg/jour) est disponible dans certains pays comme alternative. La corticothérapie permet de réduire l'inflammation (notamment via l'inactivation du facteur NF-kB) et la nécrose musculaire (Yiu et al., 2015 ; Le Guen et al., 2021).

V.1.1.2. Antagonistes des récepteurs minéralocorticoïdes

L'activation des récepteurs minéralocorticoïdes (RM) par l'aldostérone peut contribuer à la pathologie cardiaque en favorisant la mort, l'hypertrophie et la fibrose des cardiomyocytes dans la cardiomyopathie DMD et d'autres types d'insuffisance cardiaque. Pour cette raison, les antagonistes de la RM comme l'éplérénone et la spironolactone font partie de l'approche standard de prise en charge de l'insuffisance cardiaque (Meyers et al., 2019).

V.1.1.3. Tamoxifène

Le tamoxifène pourrait être utile pour le traitement des patients atteints de DMD. Il améliore la structure et la fonction des muscles dystrophiques, augmente la force des muscles des jambes au-dessus et rend ces muscles plus résistants à la fatigue, induit un changement vers un phénotype plus lent, stabilise la membrane des fibres musculaires et normalise leur diamètre, efficace pour piéger les radicaux peroxydes, stabilise les membranes biologiques, prévenir l'apoptose, inhibe la fibrose et module l'homéostasie du calcium (**Andersson et al., 2010**).

V.1.1.4. Thérapies inhibitrices de l'angiotensine

L'inhibition du système rénine-angiotensine est devenue la pierre angulaire des efforts thérapeutiques à visée cardiaque chez les patients atteints de DMD, dans le but d'améliorer le remodelage indésirable qui suit la perte de cardiomyocytes.

L'angiotensine II et le récepteur Ang II de type 1 exercent de nombreux effets néfastes sur le cœur, notamment en favorisant la fibrose, le remodelage, la production de ROS et la mort des cardiomyocytes. Les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine et les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine sont les deux principales classes de médicaments utilisés pour supprimer les effets délétères de l'angiotensine chez les patients insuffisants cardiaques en général et chez les patients atteints de DMD en particulier (**Meyers et al., 2019**).

V.1.1.5. Idébénone

L'idébenone atténuant les dommages musculaires induits par une déficience en dystrophine. Il a un effet cardioprotecteur et améliore les performances physiques. Un essai clinique de phase 3 a indiqué l'effet potentiel de modification de la maladie de l'idébenone sur la progression des paramètres cardiaques et respiratoires fonctionnels précoces dans la DMD (**Yao et al., 2021**).

V.1.1.6. Inhibition de la Myostatine

La myostatine est un peptide d'origine musculaire, qui limite la croissance des cellules musculaire. C'est un facteur de différenciation et de croissance sécrété, et connue pour avoir un rôle dans la pathogenèse de la DMD. La myostatine a été identifiée à l'origine chez la souris comme un membre de la superfamille du TGF- β qui a démontré une hypertrophie et une

hyperplasie musculaires importantes. Ainsi, le blocage de la myostatine par une stratégie anticorps améliore le profil histologique et réduit la faiblesse musculaire dans un modèle animal de la DMD. Une étude clinique a été réalisée chez l'homme avec un anticorps contre la myostatine (MYO-029) chez des patients adultes, ce traitement n'a pas augmenté la force musculaire mais il est bien toléré (**Faysoil et al., 2008 ; Damien., 2008 ; Beytía, 2012 ; Shieh et al., 2018 ; Botti et al., 2022**).

V.1.1.7. Tadalafil et Sildénafil

Tadalafil et Sildénafil sont deux inhibiteurs de la phosphodiesterase 5 (PDE5), peuvent réduire de manière significative la pathologie dystrophique chez les souris mdx. Les inhibiteurs de la phosphodiesterase 5 (PDE5) peuvent supprimer la dégradation du GMPc et amplifier davantage le signal des voies NO GMPc. Ces études indiquent que les inhibiteurs de PDE5 peuvent être des stratégies thérapeutiques potentielles pour la DMD (**Yao et al., 2021**).

V.1.2. Thérapie Génique

La thérapie génique est une technique expérimentale qui utilise des gènes pour remplacer un gène défectueux, elle est considérée comme une stratégie potentielle pour le traitement de la DMD, visant à restaurer la protéine manquante (**Figure19**) (**Barthélémy et al., 2018 ; Ricci et al., 2022**).

La thérapie génique de la DMD consiste à exprimer la dystrophine en introduisant aux cellules musculaires un gène DMD (ADNc) complet ou fonctionnellement tronqué dans un vecteur viral. Les vecteurs représentatifs couramment utilisés dans les cellules musculaires qui ne se divisent pas comprennent les vecteurs lentivirus, adénoviraux et l'adénovirus associé (AAV). Tous sont capables d'exprimer à long terme le gène exogène sans provoquer de réactions immunitaires. L'objectif de la thérapie génique est de délivrer une copie intacte du gène muté, appelé transgène, aux cellules musculaires pour permettre l'expression de la protéine fonctionnelle, puis de restaurer ou atténuer le phénotype. La capacité de charge des lentiviraux, les vecteurs adénoviraux et AAV est respectivement d'environ 8 kb, 8–36 kb et d'environ 4,7 kb (**Nakamura, 2019 ; Ricci et al., 2022**).

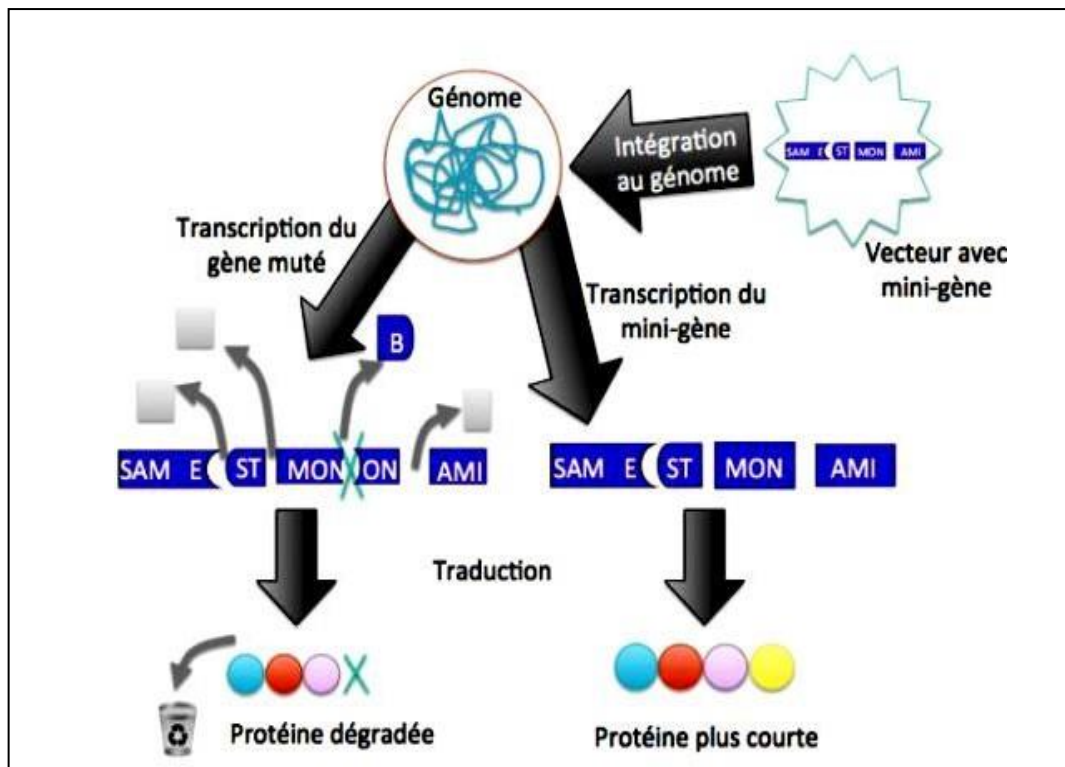


Figure 19 : Principe de la thérapie génique (Nicolas, 2012).

Un mini-gène est encapsulé dans un vecteur et injecté dans l'organisme. Ce mini-gène s'intègre au génome et est transcrit puis traduit en une protéine plus courte. La traduction de ce mini-gène se fait en complément de la traduction du gène muté du patient.

➤ A l'aide de vecteurs viraux

Les adénovirus ont été considérés comme les vecteurs les plus plausibles pour délivrer des copies modifiées d'un gène en raison de leur grande capacité d'encapsulation et de leur grande efficacité d'infection (Barthélémy et al., 2018).

Les AAV sont des vecteurs génétiques privilégiés utilisés pour le développement d'approches de thérapie génique en raison de leur capacité à cibler plusieurs tissus, tels que la rétine, le système nerveux central, le foie et les muscles (Fortunato et al., 2021), leur forme AAV recombinants sont particulièrement efficaces pour transduire les fibres musculaires squelettiques et les cardiomyocytes lorsqu'ils sont conditionnés avec la capsid appropriée, et permettent l'expression transgénique in vivo à long terme (Figure 20). Cependant, l'ADN complémentaire de la dystrophine (ADNc) a une longueur de 14 kb et dépasse la capacité d'encapsulation d'un seul vecteur rAAV (<5 kb). Par conséquent, on utilise une micro (6,3 Kb) ou mini-dystrophine (4,6 kb) qui sont des transgènes partiellement fonctionnels qui contiennent des domaines essentiels de la protéine dystrophine (Nakamura, 2019 ; Creisméas et al., 2021 ; AFM Téléthon, 2021).

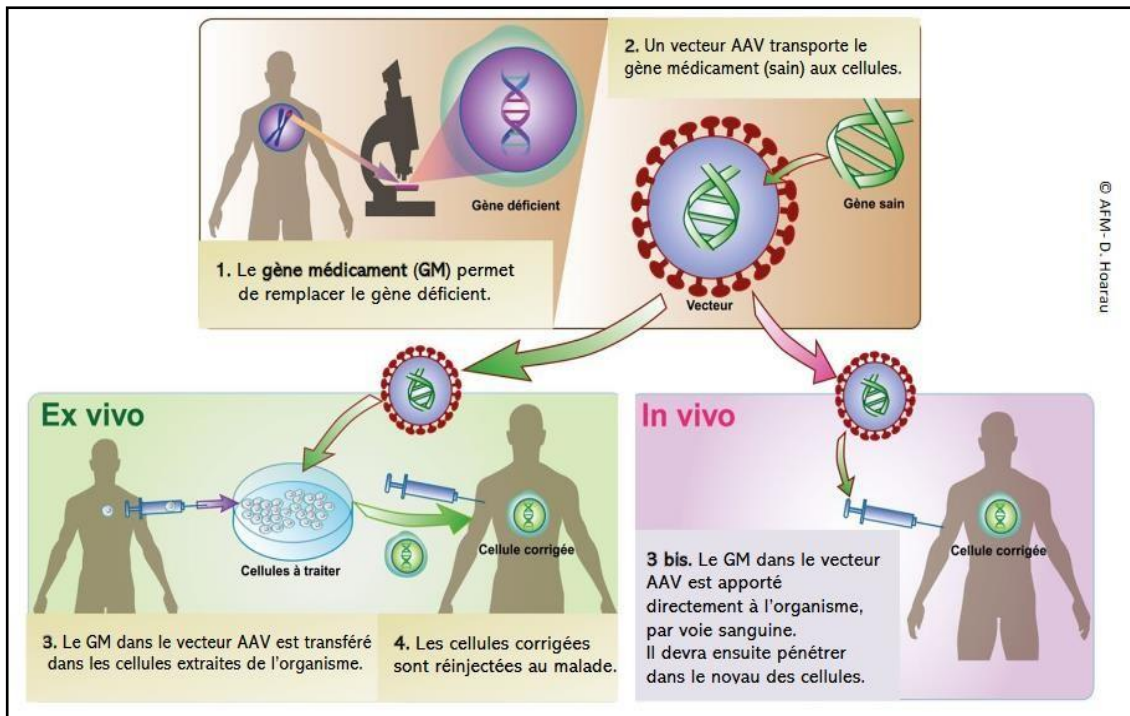


Figure 20 : Etapes de la thérapie génique via la micro-dystrophine (AFM Téléthon, 2021).

Les vecteurs lentiviraux issus des virus humains de l'immunodéficience-1 (VIH-1) peut s'intégrer dans le génome de l'hôte et obtenir une expression transgénique à long terme. Néanmoins, les myofibres transduites avec un ADNc fonctionnel de 6,3 kb de la dystrophine de type Becker (gène de la mini-dystrophine) était partiellement protégé contre la dégénérescence pendant au moins six mois chez des souris mdx. L'utilisation potentielle de ce système de vecteur pour le transfert stable de gènes vers le muscle est donc d'un grand intérêt, car il pourrait théoriquement être utilisé pour le transfert de gènes vers des myofibres post-mitotiques ou vers une variété de cellules souches à potentiel myogénique (**Figure 21**) (**Li et al., 2005 ; Nakamura, 2019 ; Morgan et al., 2021**).

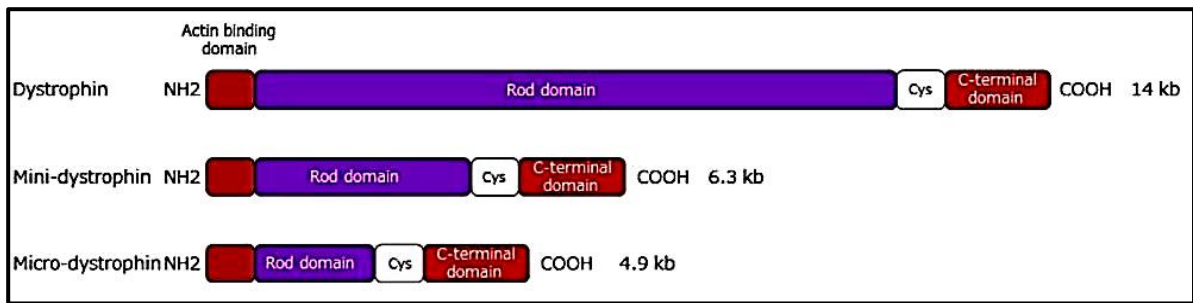


Figure 21 : Structure des mini- et microdystrophines (Nakamura, 2019).

La minidystrophine est une dystrophine de patients atteints de BMD légère d'une taille d'environ 6,4 kb. Sur cette base, la région de la tige a été encore tronquée pour créer de la microdystrophine (4,9 kb) pouvant être incorporée dans des vecteurs viraux. Les deux dystrophines conservent le domaine de liaison à l'actine, riches en cystéine (Cys) et C-terminaux de la dystrophine normale de pleine longueur (14 kb).

➤ **A l'aide de vecteurs non-viraux de type plasmide d'origine synthétique**

Les plasmides sont des vecteurs synthétiques. Ils peuvent contenir des gènes de grande taille et sont moins susceptibles de provoquer une réaction immunitaire importante : ils ne renferment pas de protéines immunogènes. Selon des études sur des souris mdx, ils ont permis de restaurer l'expression de la dystrophine dans de nombreuses fibres musculaires. L'efficacité du transfert de gène semble, cependant, moindre qu'avec les AAV, en injection intra-musculaire. Mais, ils ne permettent pas une expression à long terme du gène thérapeutique (AFM, 2009).

V.1.3. Translecture de codon stop

Toute synthèse protéique normale se termine par un codon stop (UAG, UAA ou UGA). Chez près de 10–15 % des patients atteints de DMD ou BMD, une mutation ponctuelle transforme un codon de lecture en un codon stop avant la fin de la synthèse protéique ce qui donne une protéine non fonctionnelle ou avec fonction réduite (Focus, 2015 et Lütschg, 2018).

L'ataluren est le premier médicament utilisé pour le traitement de DMD, composé d'une molécule dite PTC124, cette dernière inhibe la reconnaissance des codons « stop » prématurés pendant la traduction et permet d'ignorer le codon stop précoce et de rétablir la transcription d'une protéine plus fonctionnelle. Elle préserve cliniquement de manière significative la marche, qui est prédictive de la progression de la maladie chez les patients atteints de DMD et le ralentissement de la progression de la maladie (Figure 22) (Focus, 2015 ; Péréon et al., 2016 ; Mercuri et al., 2020).

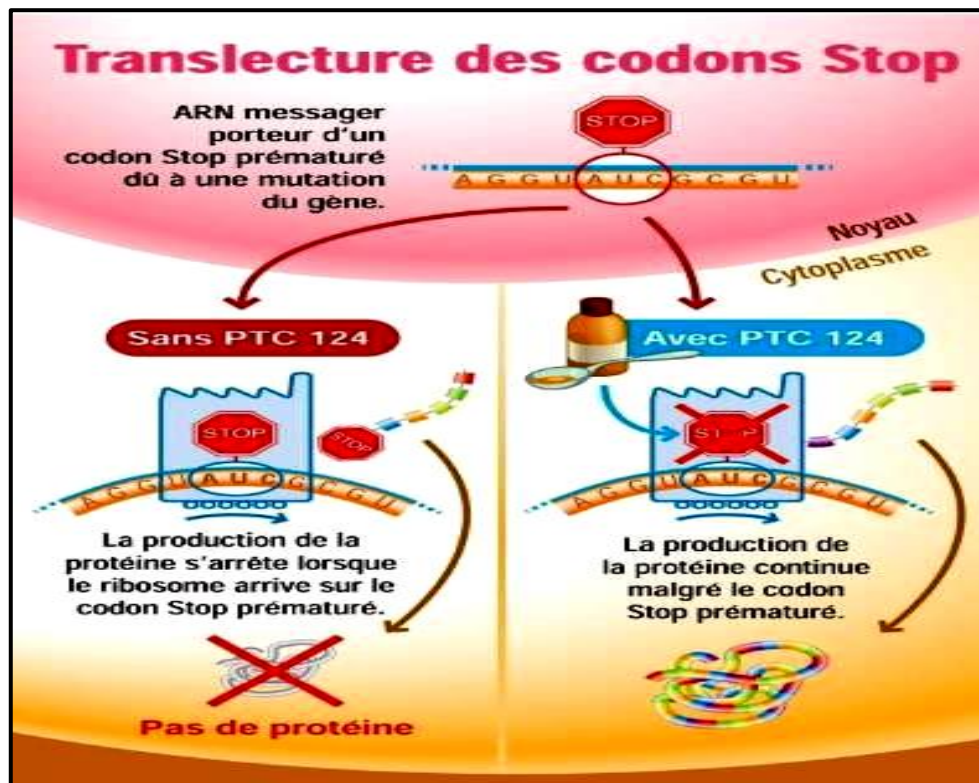


Figure 22 : Translecture du codon stop (AFM Téléthon, 2021).

D'autres médicaments tels que la Gentamycine qui est un antibiotique aminoglycoside permettent aux ribosomes d'ignorer le codon stop et de continuer la synthèse de la protéine. L'administration de cet antibiotique a restauré l'expression de la dysrophine à peu près de 20 % du niveau normal mais l'efficacité globale n'est pas claire (Nicolas, 2012 ; Sun et al., 2020).

V.1.4. Saut d'exon

Le saut d'exon est une technique qui rend possible la fabrication d'une protéine à partir d'un gène comme le gène de la dystrophine (DMD). L'idée de cette technique basée sur la modulation de l'ARN en permettant de rétablir le cadre de lecture. Ce type de molécules agit au niveau de la maturation de l'ARN pré-messager en ARN messager matures (ARNm) du gène permettant une expression de la dystrophine dans le muscle. L'efficacité d'une telle technique a été prouvée sur des cultures primaires de myoblastes de souris mdx mais également sur des cultures de myocytes issus de patients DMD par délétion de l'exon 45. Parmi les études à base de cette technique celle approuvée par l'équipe Française de Pietri Rouxel de l'institut de myologie qui a développé une approche combinée le saut d'exon classique utilisant des souris mdx. Les chercheurs ont effectué chez ces souris, après la naissance, trois injections d'oligonucléotides anti sens de dernière génération (les PPMO- oligonucléotides morpholino liées à un peptide), les résultats ont été publiés dans la revue *Molecular Therapy Methods and Clinical Development* montrent que ce traitement s'avère particulièrement efficace. Les chercheurs ont observé aussi

une augmentation de la survie des souris traitées soit 52 semaines au lieu de 7 sans traitement ; une amélioration de la force des muscles squelettiques ; une préservation durable du diaphragme et du cœur ; une préservation aussi du muscle contre la fibrose et l'inflammation (**Fernandez et al., 2010 ; Focus, 2015 ; Institut de myologie, 2020 ; AFM Téléthon, 2022**).

V.1.5. Utrophine

L'utrophine est un homologue de la dystrophine ; son gène est situé sur le chromosome 6q24 chez l'homme et il est transcrit par deux promoteurs (A et B). Cette protéine a un poids moléculaire de 395 kDa et possède des domaines similaires à la dystrophine. Elle permet de compenser le manque de dystrophine chez tous les patients DMD indépendamment de leur mutation (**Guiraud et al., 2015**).

L'utrophine et la dystrophine ont des domaines N terminaux, riches en cystéine et C terminaux structurellement similaires et partagent de nombreux partenaires de liaison, tels que le β dystroglycane, l' α dystrobrevine et la F actine. L'utrophine et la dystrophine ont des profils d'expression distincts ; elle est exprimée dans les muscles en développement précoce au niveau du sarcolemme et est progressivement remplacée par la dystrophine. À l'âge adulte, elle est exprimée dans un large éventail de tissus; L'utrophine A se localise à la jonction neuromusculaire et à la jonction myotendineuse dans les muscles, tandis que l'utrophine B est exprimée dans les cellules endothéliales. Lors d'une lésion musculaire, l'expression de l'utrophine A est réactivée au niveau du sarcolemme dans les myofibrilles régénérées. En l'absence de dystrophine, l'expression de l'utrophine A est régulée positivement au niveau du sarcolemme chez la souris mdx et les patients DMD dans le cadre du processus de régénération (**Figure 23**) (**Sinnreich, 2010 ; Guiraud et al., 2015**).

Des études récentes sur des souris mdx utilisent la metformine qui est un médicament utilisé dans le traitement du diabète de type 2 montrant des effets intéressants en modulant l'expression du gène de l'utrophine (**Le Guen et al., 2021**).

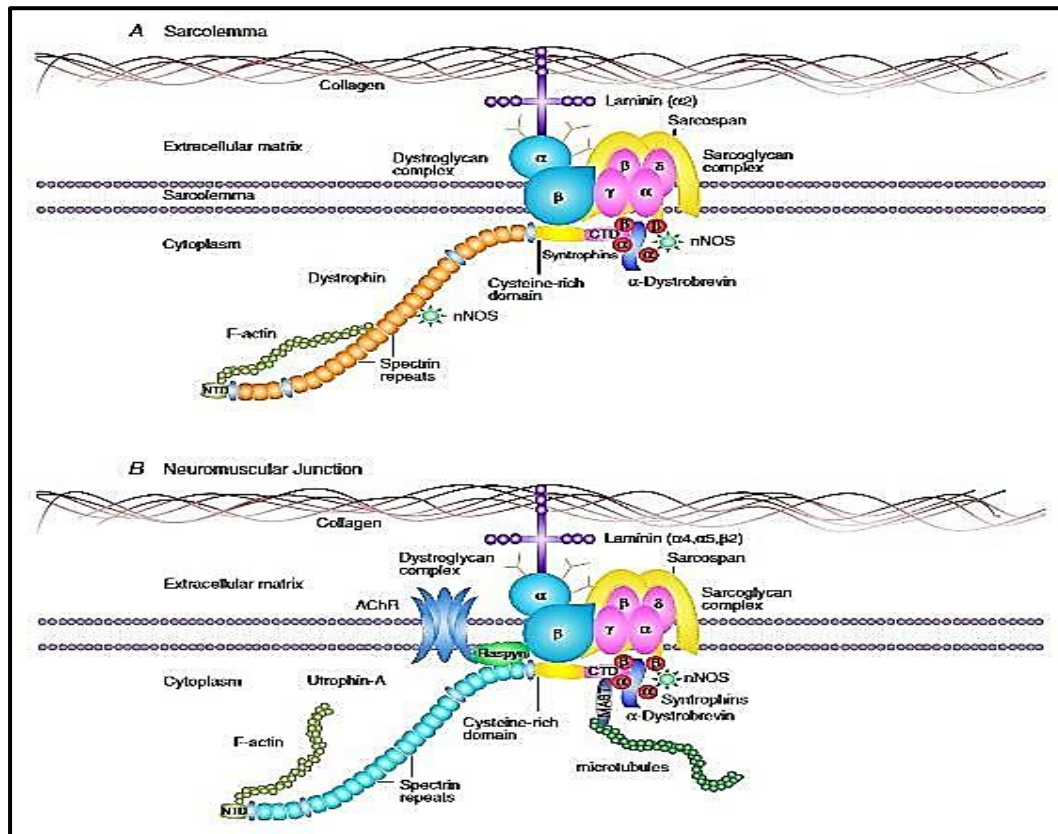


Figure 23 : Complexes protéiques associés à la dystrophine et à l'utrophine (Guiraud et al., 2015).

V.I.6. Thérapie cellulaire

Contrairement aux méthodes pharmacologiques basées sur l'emploi de molécules chimiques, la thérapie cellulaire est fondée sur l'utilisation de cellules vivantes. L'objectif est de remplacer des cellules déficientes ou disparues par des cellules saines. Cette technique consiste à prélever des cellules soit chez le patient à traiter lui-même (autogreffe), soit chez un donneur (allogreffe) associées à une thérapie immunosuppressive, cette dernière permet de réduire la réaction immunitaire de l'hôte contre la greffe. Ces cellules sont purifiées, éventuellement modifiées, puis multipliées au laboratoire, puis injectées dans l'organe à traiter de la personne malade. Différents types de cellules sont utilisés par les chercheurs dans le but de remplacer les cellules musculaires qui ont dégénéré dans la DMD (**Figure 24**) (AFM, 2009 ; Lannitti et al., 2012).

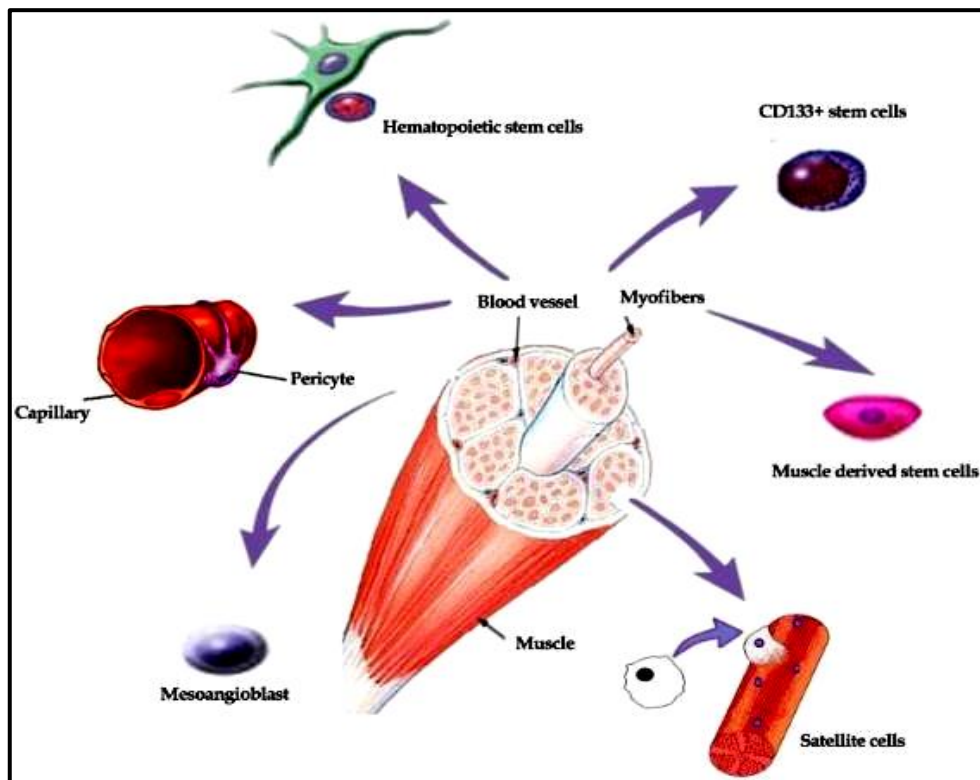


Figure 24 : Sources possibles de cellules souches myogéniques isolées du sang et des muscles dans le traitement de la DMD (Farini et al., 2009).

V.1.6.1. Cellules souches multipotentes dérivées du muscle (CSMD)

Des études récentes ont suggéré l'existence d'une population de cellules souches multipotentes dérivées du muscle (CSMD) qui réside dans le muscle squelettique partageant la capacité de s'autorenouveler et de se différencier en d'autres types de cellules mésodermiques. Parmi eux les cellules souches CD34 qui peuvent migrer de la circulation vers les tissus musculaires de l'hôte après injection intra-artérielle et induire l'expression de la dystrophine dans tous les muscles de la région injectée chez les souris mdx (Torrente et al., 2001 ; Farini et al., 2009).

V.1.6.2. Cellules souches pluripotentes induites (CSPi)

Cellules souches pluripotentes induites sont des cellules somatiques capables de se différencier en cellules précurseurs musculaires et injectées dans les muscles. Après l'injection, la protéine dystrophine sera restauré, se régénère et conduit à des niveaux de dystrophine plus élevés. Les tests fonctionnels ont montré une amélioration. Des expériences dans ce domaine ont montré que les cellules CSPi sont capables de s'intégrer aux cellules musculaires et de s'installer dans la population de cellules satellites (Van Westering et al., 2015 ; Barthélémy et al., 2018).

V.1.6.3. Cellules satellites

Les cellules satellites sont des cellules souches musculaires cible pour les thérapies de lutte contre la DMD. En raison de leur activation constante pour tenter de compenser la dégénérescence musculaire incessante de la DMD. Le pool de cellules satellites s'épuise dans le tissu dystrophique, entraînant un échec de réparation musculaire et une progression accélérée de la maladie. Des approches de transplantation de cellules satellites sont encore à l'étude afin de tenir compte de leurs inconvénients. Par exemple, l'hétérogénéité des cellules satellites cultivées les rend peu fiables dans quelques thérapies de transfert, alors que le transfert avec succès a démontré que l'injection intramusculaire de myoblastes sains chez des souris mdx entraîne une fusion avec les fibres de l'hôte et une production importante de dystrophine (**Duan et al., 2021 ; Den Hartog et al., 2022**).

V.1.6.4. Mésoangioblastes, cellules souches sanguines et musculaires CD133

Les mésoangioblastes sont des cellules souches dérivées de la moelle osseuse, les CD133, cellules souches dérivées du sang ou du muscle et péricytes, administrés dans la circulation sanguine ont la capacité de se migrer hors des vaisseaux et de se différencier en cellules musculaires squelettiques et vasculaires chez les sujets atteints de DMD. Ces cellules génétiquement corrigées sont délivrées par voie intra artérielle au muscle dystrophique de souris, ils induisent une amélioration fonctionnelle spectaculaire du phénotype dystrophique (**Braun, 2011 ; Lannitti et al., 2012**).

V.2. Nouvelles approches thérapeutiques

Après des débuts difficiles marqués par une période de prudence et de scepticisme, le domaine de la thérapie génique se trouve dans une phase optimiste et dynamique. De nombreux protocoles cliniques sont en cours pour traiter diverses maladies monogéniques, avec parfois des résultats remarquables. Les technologies de thérapie génique sont avancées, diversifiées et continuent de progresser rapidement. Les premiers médicaments qui arrivent sur le marché constituent une rupture dans le domaine pharmaceutique qui devrait permettre, dans un futur proche, le traitement de nombreux patients atteints de maladies rares (**Ann et al., 2017**).

V.2.1. Oligo-nucleotides thérapeutique

Les oligo-nucleotides thérapeutique sont des petits acides nucléiques de synthèse capables de moduler l'expression de gènes cibles et leurs transcrits. Ils interfèrent avec des mécanismes physiopathologiques en modulant l'expression de cibles thérapeutiques d'intérêt.

Conçues pour interagir avec leurs cibles, ARN ou ADN. Parmi eux les oligonucléotides modulateurs d'épissages de type activateurs de l'expression génique, qui ont été approuvés et utilisés pour la gestion de la DMD dont le principe de la stratégie de traitement est le saut d'exon (**Crouvezier et al., 2023**).

Les modulateurs d'épissages appelées OAS (les Oligonucléotides Anti Sens) sont des courtes séquences d'ADN simple brin d'environ vingt nucléotides qui s'hybrident à des séquences cible de l'ARNm prématuré et induire sa dégradation par la ribonucléase H (RNAase H) pour modifier la composition exonique de l'ARNm mature et par conséquent, la séquence de la protéine traduite et cela grâce à la stratégie du saut d'exon (**Figure 25**) (**Crouvezier et al., 2023**).

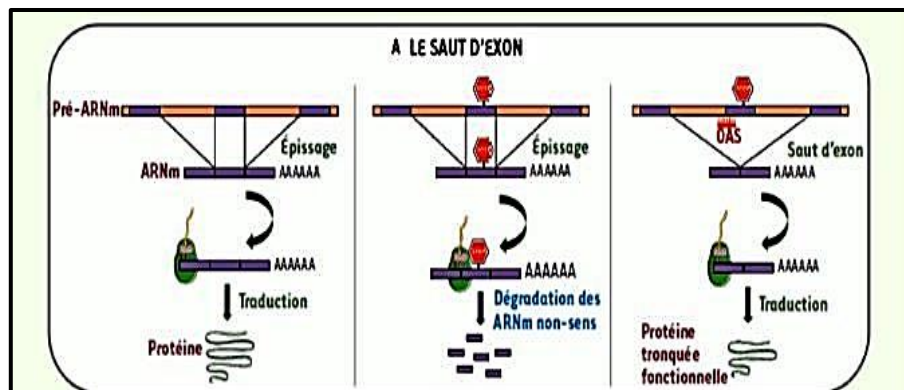


Figure 25 : Restauration de protéines fonctionnelles par modulation d'épissage (**Crouvezier et al., 2023**).

V.2.2. Oligonucléotides antisens (OAS) chimiquement modifiés

En fait, les oligonucléotides antisens approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) sont les OAS chimiquement modifiés. Des modifications chimiques permettent de stabiliser les OAS. La substitution d'un atome d'oxygène non pontant par un atome de soufre transforme la liaison phosphodiester en phosphorothioate (PS), ce qui les rend plus résistants à la dégradation par les nucléases et sans empêcher celle de la RNAse H. Utilisant un encombrement stérique contiennent soit une modification ribose 2' -O-méthyle, soit des oligomères de morpholino-phosphorodiamidate (PMO). Dans les PMO, le sucre est remplacé par un cycle morpholino et le squelette contient une liaison phosphorodiamidate neutre. Il existe quatre médicaments à base de PMO : eteplirsén, golodirsén, vitolarsén et casimersén, approuvés pour le traitement de la DMD et un médicament à base de ribose 2' -O-méthyle : drisapersén. Ces PMO

modulent l'épissage par des mécanismes basés sur le saut d'exon, où ils se lient au pré-ARNm et empêchent le spliceosome d'accéder au site d'épissage du transcrit (**Figure 26, 27**) (**Paradeep et al., 2023 ; Crouvezier et al., 2023**).

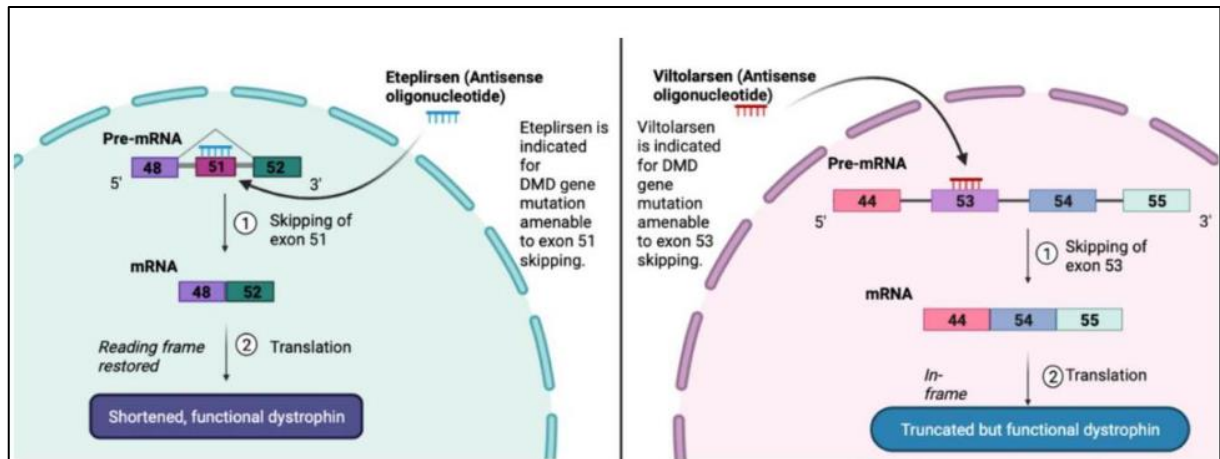


Figure 26 : Mécanismes d'Eteplirsen et de Viltolarsen dans la dystrophie musculaire de Duchenne (**Pasha et al., 2022**).

Eteplirsen se lie à l'exon 51, entraînant son exclusion, produisant une protéine dystrophine raccourcie, mais fonctionnelle. Viltolarsen cible le saut de l'exon 53, ce qui entraîne une protéine dystrophine tronquée mais fonctionnelle

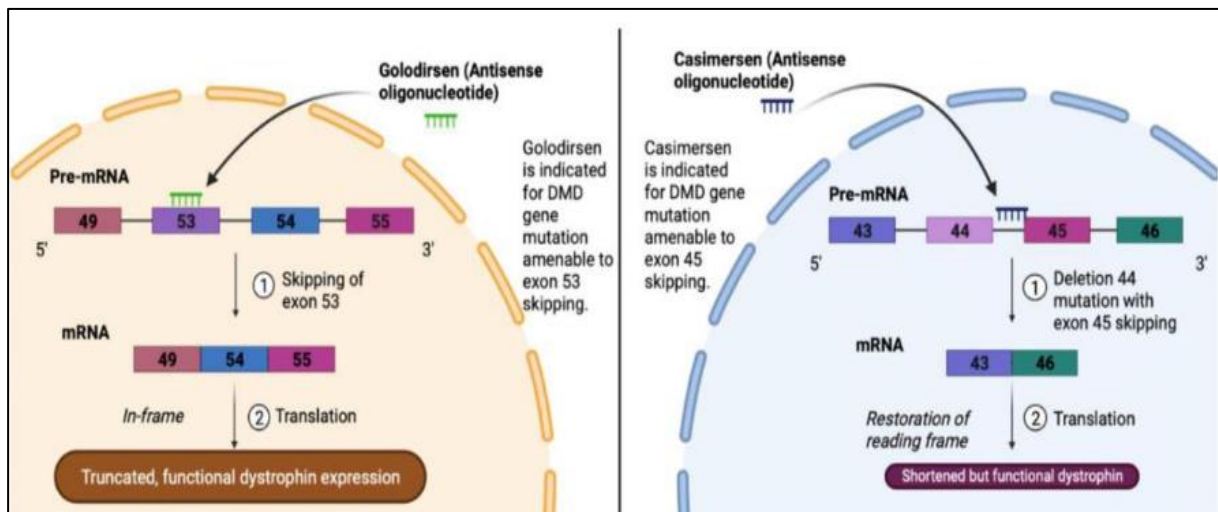


Figure 27 : Mécanisme de Golodirsen et Casimersen dans la dystrophie musculaire de Duchenne (**Pasha et al., 2022**).

Golodirsen se lie et exclut l'exon 53, résultant en une protéine dystrophine raccourcie mais fonctionnelle. Mutation par délétion 44 avec exclusion de l'exon 45 médiée par casimersen, entraînant une protéine dystrophine raccourcie mais fonctionnelle.

V.3. Dernières avancées thérapeutiques

En fait, la découverte de l'outil d'édition génomique CRISPR-Cas9 parmi des avancées significatives et prometteuses dans le traitement des dystrophies musculaires (**Gilgenkrantz, 2014**).

V.3.1. Système de CRISPR-Cas 9

Le système CRISPR-Cas 9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)-Cas9 (CRISPR-Associated protein 9) a été découvert chez les bactéries, un outil d'édition génomique permet de modifier précisément une séquence génomique. Il est composé d'une enzyme, Cas9, et d'un ARN guide synthétique (ARNg) qui forment ensemble un complexe ribonucleo-protéique. Le mécanisme de l'édition du génome CRISPR/Cas-9 peut généralement être divisée en trois étapes : reconnaissance, clivage et réparation (**figure 28**).

L'enzyme Cas9 chargée avec l'ARN guide reconnaît une séquence complémentaire située à côté d'une séquence spécifique de 3 à 5 nucléotides (séquence PAM, Protospacer Adjacent Motif). Lorsque le complexe Cas9-ARNg reconnaît le site cible, il déclenche la dénaturation locale de l'ADN et l'invasion dans l'ADN du brin d'ARN pour assurer le clivage de la double hélice. La coupure double brin créée par l'enzyme Cas 9 est alors réparée soit par jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ pour Non Homologous End Joining), résultant en de petites insertions et/ou délétions aléatoires sur le site de clivage, soit par réparation fondée sur l'homologie (HDR pour Homology-Directed-Repair), réparation dirigée qui entraîne une modification précise du génome (**Ballouhey et al., 2020 ; Asmamaw et al., 2021**).

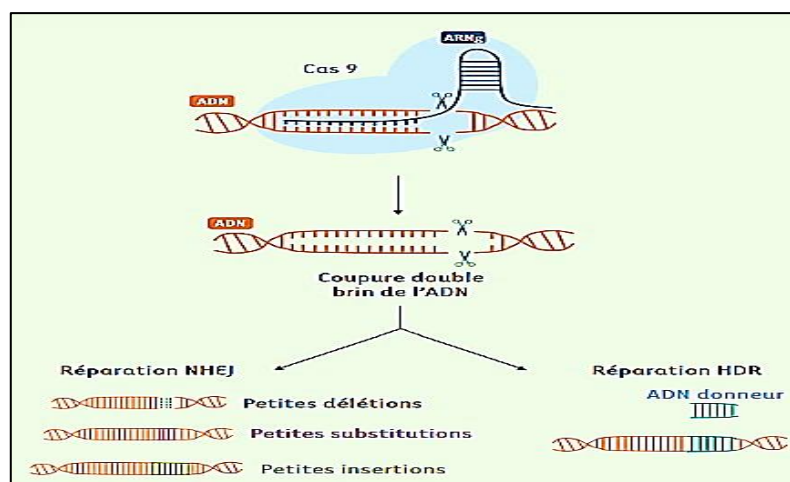


Figure 28 : Mécanismes d'action du système CRISPR-Cas9 (**Ballouhey et al., 2020**).

Pour délivrer cet outil d'édition génomique dans les organes cibles, de nombreuses méthodes ont été utilisées. La méthode de transport la plus utilisée *in vitro* est la transfection d'ADN plasmidique. *In vivo*, certaines études utilisent des méthodes de transport non-viral pour acheminer le système CRISPR-Cas9, telles que le transport hydrodynamique ou encore le transport par nanoparticules. La méthode la plus utilisée pour transporter le système CRISPR-Cas9 *in vivo* reste le transport par AAV (**Ballouhey et al., 2020**).

Pour la première fois, une équipe américaine a appliqué le système CRISPR/Cas9 pour éliminer l'exon 51 dans le but de restaurer la dystrophine chez 4 chiens deltaE50-MD âgés d'un mois. Les chercheurs ont utilisé des AAV pour administrer le système CRISPR/Cas9 soit par injection intramusculaire (2 chiens) avec un suivi de 6 semaines, soit par injection intraveineuse (2 chiens) avec un suivi de 8 semaines. Les résultats publiés dans la revue *Science* d'octobre 2018 ont mis en évidence une augmentation de production de dystrophine non seulement dans les muscles mais aussi dans le cœur de tous les chiens (après injection intraveineuse) (**AFM Téléthon, 2018**).

Deux équipes Amoasii et collaborateur et Sui et collaborateur ont également utilisé le système CRISPR-Cas9 afin d'obtenir des organismes modèles de DMD : une souris dont l'exon 50 du gène DMD a été délétée, et un lapin possédant des mutations dans l'exon 51 du même gène (**Ballouhey et al., 2020**).

Duchêne et ses collaborateurs ont ainsi restauré la cadre de lecture de la dystrophine à partir de quatre biopsies musculaires de patients atteints de DMD (chaque biopsie possédant une délétion d'un exon différent). Pour cela, ces auteurs ont utilisé l'enzyme Cas 9 et deux ARN guides ciblant chacun l'exon 47 et l'exon 58 du gène DMD afin de déléter les exons 48 à 57. Cette technique a permis de restaurer l'expression d'une forme plus courte de dystrophine fonctionnelle dans les cellules des quatre patients (**Ballouhey et al., 2020**).

Ifuku et ses collaborateurs ont altéré le site accepteur d'épissage dans l'exon 45 par la délivrance de plasmide du système CRISPR Cas9 dans des CSPi, dérivé d'un patient DMD. Dans le cas des patients DMD dont l'exon 44 a été supprimé, le saut de l'exon 45 devrait être efficace pour restaurer l'expression de la protéine dystrophine dans des myoblastes différenciés (**Ifuku et al., 2018**).

Ainsi, les travaux de l'équipe de Long sur des souris mdx, ciblant l'exon 23, par l'utilisation de CRISPR/Cas9 et deux ARN guides ciblant les introns 22 et 23 et supprime cette mutation, dans le but de restaurer le cadre de lecture de gène. Dans le même contexte l'équipe

Matre et al. Ont, eux, obtenu la restauration de la dystrophine en ciblant aussi l'exon 23 du gène DMD dans des progéniteurs musculaires de souris mdx utilisant CRISPR-Cas9 et un ADN donneur (exon 23 correcte) afin d'induire une réparation par homologie (HDR) et cela donne des résultats encourageants (**Figure 29**) (**Bellouhey et al., 2020 ; Prat, 2020**).

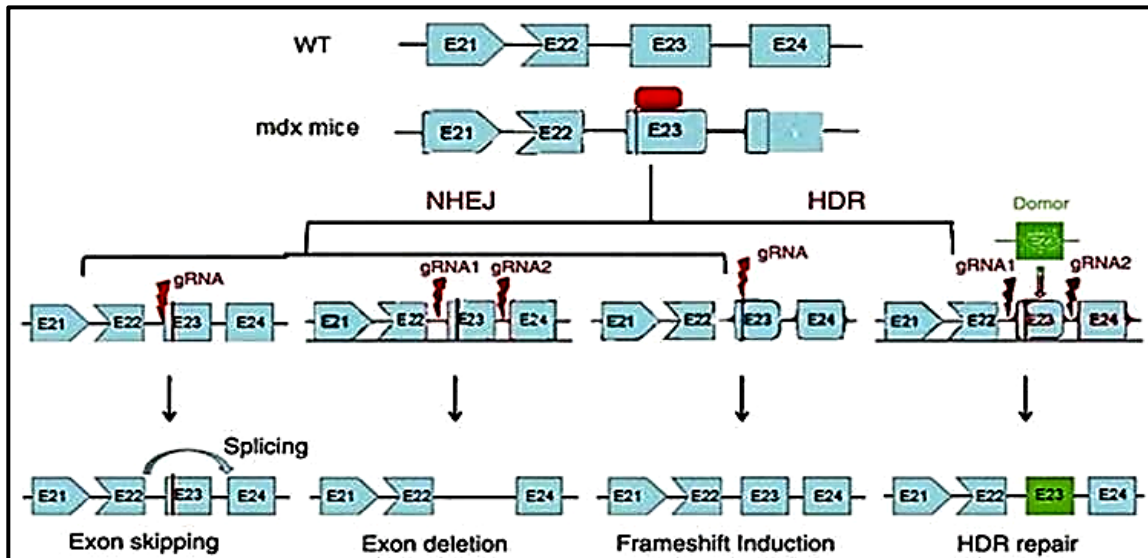


Figure 29 : Mécanismes de la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) et de la correction génique médiée par la réparation dirigée par l'homologie (HDR) par des répétitions palindromiques courtes régulièrement espacées (CRISPR)-Cas9 (**Prat, 2020**).

En haut : Le gène DMD de la souris normale et la mutation ponctuelle du gène DMD chez la souris mdx qui crée un codon stop prématuré. CRISPR-Cas9 peut corriger ce défaut génétique de l'une des trois manières suivantes par la réparation du NHEJ - saut d'exon, suppression d'exon et induction de décalage de cadre qui diffèrent selon les sites cibles et le nombre d'ARNg. De plus, il peut modifier la mutation de manière précise par réparation HDR s'il reçoit un modèle donneur dans un état approprié.

Conclusion

Les dystrophies musculaires de Duchenne et Becker sont un ensemble de pathologies musculaires rares, caractérisées par une faiblesse et une dégénérescence progressive du muscle. Ce sont des maladies d'origine génétique liées à X causées par des mutations au niveau du gène DMD codant la protéine dystrophine d'où leur nom, impliquée dans les fonctions musculaires.

Depuis plusieurs années, de nombreuses pistes de recherche sont suivies pour tenter de mettre au point un traitement curatif de la DMD. Le développement de traitements pharmacologiques comme corticostéroïdien, la thérapie génique, qui intervient directement sur le gène de la dystrophine, la thérapie cellulaire qui consiste en la transplantation de cellules saines dans les muscles des patients atteints mènent à l'amélioration du pronostic clinique, l'espérance et la qualité de vie des patients. Néanmoins ces traitements palliatifs ne guérissent pas.

Les chercheurs développent des nouvelles approches thérapeutiques permettant de restaurer la fonction des muscles cardiaques, respiratoires et squelettiques à des niveaux cliniquement pertinents, ciblant le défaut génétique, notamment la thérapie par saut d'exon, par édition de gènes via des vecteurs viraux et par l'édition du génome à l'aide de la technologie CRISPR-Cas 9. Malgré qu'elles ne sont pas applicables à tous les patients DMD mais les résultats préliminaires pour la correction génétique soient encourageants.

*Références
bibliographiques*

- Aartsma-Rus, A., Ginjaar, I. B., & Bushby, K.** (2016). The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *Journal of medical genetics*, 53(3), 145-151.
- AFM Téléthon.** (2018). Succès du système CRISPR/Cas9 chez un chien modèle de myopathie de Duchenne.
- AFM Téléthon.** (Août 2020). La dystrophie musculaire de Duchenne.
- AFM Téléthon.** (Janvier 2021). Les dystrophinopathies chez les femmes.
- AFM Téléthon.** (Juin 2021). Avancées dans les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker, Savoir & Comprendre.
- AFM Téléthon.** (Juin 2022). Avancées dans les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker.
- AFM.** (2003). Le muscle squelettique.
- AFM.** (2009). Zoom sur la recherche dans la dystrophie musculaire de Duchenne.
- Allen, D. G., Whitehead, N. P., Froehner, S. C.** (2016). Absence of dystrophin disrupts skeletal muscle signaling: roles of Ca²⁺, reactive oxygen species, and nitric oxide in the development of muscular dystrophy. *Physiological reviews*, 96(1), 253-305
- Andersson, D. C., Marks, A. R.** (2010). Fixing ryanodine receptor Ca²⁺ leak—a novel therapeutic strategy for contractile failure in heart and skeletal muscle. *Drug discovery today: disease mechanisms*, 7(2), e151-e157.
- Anne, G. A. L. Y.** (2017). L'émergence des médicaments de thérapie génique pour les maladies rares. *Biofutur*, 36(383), 26.
- Asmamaw, M., Zawdie, B.** (2021). Mechanism and applications of CRISPR/Cas-9-mediated genome editing. *Biologics: Targets and Therapy*, 353-361.
- Ballouhey, O., Bartoli, M., & Levy, N.** (2020). CRISPR (R) ation musculaire. *Médecine/sciences*, 36(4), 358-366.
- Barthélémy, F., & Wein, N.** (2018). Personalized gene and cell therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*, 28(10), 803-824.

- Ben Yaou, R., Nicolas, A., Leturcq, F., & Le Rumeur, É.** (2016). eDystrophin : un nouvel outil dédié à une meilleure compréhension des dystrophinopathies. *Les Cahiers de Myologie*, (13), 15-24.
- Beytía, M. D. L. A., Vry, J., & Kirschner, J.** (2012). Drug treatment of Duchenne muscular dystrophy: available evidence and perspectives. *Acta Myologica*, 31(1), 4.
- Biomnis.** (2012). Précis de biopathologie analyse médical spécialisé, Créatine kinase et isoenzyme.
- Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E., & Davies, K. E.** (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiological reviews*. 82, 291–329.
- Botti, V., Menzel, O., Staedler, D.** (2022). A state-of-the-art review of tamoxifen as a potential therapeutic for duchenne muscular dystrophy. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 4887.
- Braun, S.** (2011). Perspectives thérapeutiques innovantes des maladies neuromusculaires. *Journal de Réadaptation Médicale : Pratique et Formation en Médecine Physique et de Réadaptation*, 31(3-4), 189-193.
- Brun, C. E., & Dumont, N. A.** (2016). Déficiets intrinsèques des cellules satellites dans la dystrophie musculaire de Duchenne. *Médecine/sciences*, 32(10), 800-802.
- Centre de référence des maladies neuromusculaires Atlantique Occitanie Caraïbes (AOC).** (2019). Protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDS) Dystrophie musculaire de becker.
- Chelly, J., & Kaplan, J. C.** (1988). La myopathie de Duchenne, du gène DMD à la dystrophine, *médecine sciences*, 4 : 141-150.
- Cherin. P.** (1995). Dystrophinopathies and related disorders. *Curr Opin Rheumatol*. Nov ;7(6) :475- 485.
- Creisméas, A., Gazaille, C., Bourdon, A., Lallemand, M. A., François, V., Allais, M., ... & Fraysse, B.** (2021). TRPC3, but not TRPC1, as a good therapeutic target for standalone or complementary treatment of DMD. *Journal of Translational Medicine*, 19, 1-17.
- Cretoi, D., Pavelescu, L., Duica, F., Radu, M., Suci, N., & Cretoi, S. M.** (2018), Myofibers, Springer Nature Singapore, Muscle Atrophy, 23-46.
- Crouvezier, N., Marie, A. C., Moumné, L.** (2023). Mécanismes d'action et brevetabilité des oligonucléotides thérapeutiques. *Médecine/sciences*, 39(2), 111-118.

- Damien, F. (2008).** Masse musculaire et myostatine, VI^{ème} journées annuelles de la société française de myologie.
- Darras, B. T., Urion, D. K., Ghosh, P. S., Adam, M. P., Ardinger, H. H., & Pagon, R. A. (2022).** Dystrophinopathies. editors. *Gene Reviews*[®]. University of Washington, 37 p.
- Den Hartog, L., Asakura, A. (2022).** Implications of notch signaling in Duchenne muscular dystrophy. *Frontiers in Physiology*, 2024.
- Desguerre I, Laugel V. (2015).** Diagnostic et histoire naturelle de la dystrophie musculaire de Duchenne. *Elsevier Masson SAS*, 22(12 Suppl 1):12S24-30.
- Duan, D., Goemans, N., Takeda, S. I., Mercuri, E., Aartsma-Rus, A. (2021).** Duchenne muscular dystrophy. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), 13.
- Dugas Camille, (2019),** Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) : Impact des traitements dans la pathologie Étude au CHU d'Angers. Thèse Doctorat, université d'Angers.
- Ehmsen, J., Poon, E., & Davies, K. (2002).** The dystrophin-associated protein complex. *Journal of cell science*, 115(14), 2801-2803.
- Emery, A. E. (2002).** The muscular dystrophies. *The Lancet*, 359(9307), 687-695.
- Epomedicine. (2018).** Gowers's sign, <http://epomedicine.com/clinical-medicine/gowers-sign/>.
- Farini, A., Razini, P., Erratico, S., Torrente, Y., Meregalli, M. (2009).** Cell based therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Journal of cellular physiology*, 221(3), 526-534.
- Fayssoil, A., Orlikowski, D., Nardi, O., & Annane, D. (2008).** Atteintes cardiaques au cours de la myopathie de Duchenne. *La Presse Médicale*, 37(4), 648-653.
- Fernandez, C., Halbert, C., de Paula, A. M., Figarella-Branger, D., Chabrol, B., & Pellissier, J. F. (2010).** Dystrophies musculaires liées au gène DMD : myopathie de Duchenne, myopathie de Becker, formes féminines et atypiques. *EMC-Neurologie*, 1-15.
- Flanigan, K. M. (2014).** Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurologic clinics*, 32(3), 671-688.
- Focus, (2015).** Société Française de Pédiatrie. Dystrophie musculaire de Duchenne.
- Fortunato, F., Farnè, M., & Ferlini, A. (2021).** The DMD gene and therapeutic approaches to restore dystrophin. *Neuromuscular Disorders*, 31(10), 1013-1020.

- Frontera, W. R., Ochala, J.** (2015). Skeletal muscle: *a brief review of structure and function*. *Calcified tissue international*, 96, 183-195.
- Gao, Q., & McNally, E. M.** (2015). The Dystrophin Complex: structure, function and implications for therapy. *Comprehensive Physiology*, 5(3), 1223.
- Gerthoffer, W. T.** (2005). Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle contraction. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 83(10), 851-856.
- Gilgenkrantz H.** (2014). The revolution of the CRISPR is underway. *Med Sci*. 30(12):1066-9.
- Gillis, J. M.** (2004). Guérir la myopathie de Duchenne par l'utrophine. *M/S: médecine sciences*, 20(4), 442-447.
- Guilbaud, M.** (2018). Identification d'ARNs non-codants impliqués dans les dystrophinopathies. Thèse doctorat, Université Sorbonne.
- Guilbaud, M., Gentil, C., Peccate, C., Gargaun, E., Holtzmann, I., Gruszczynski, C., & Piétri-Rouxel, F.** (2018). miR-708-5p and miR-34c-5p are involved in nNOS regulation in dystrophic context. *Skeletal Muscle*, 8(1), 1-13.
- Guiraud, S., Chen, H., Burns, D. T., & Davies, K. E.** (2015). Advances in genetic therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy. *Experimental physiology*, 100(12), 1458-1467.
- Hoffman, E. P., & Kunkel, L. M.** (1989). Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron*, 2(1), 1019-1029.
- Ifuku, M., Iwabuchi, K. A., Tanaka, M., Lung, M. S. Y., & Hotta, A.** (2018). Restoration of dystrophin protein expression by exon skipping utilizing CRISPR-Cas9 in myoblasts derived from DMD patient iPS cells. *Exon Skipping and Inclusion Therapies: Methods and Protocols*, 191-217.
- Institut de myologie.** (2020). DMD : une équipe de l'institut développe une approche combinée saut d'exon classique-thérapie génique. France.
- Kamdar, F., & Garry, D. J.** (2016). Dystrophin-deficient cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 67(21), 2533-2546.
- Lannitti, T., Lodi, D., Sblendorio, V., Rottigni, V., & Palmieri, B.** (2012). Exon Skipping and Myoblast Transplantation: Single or Combined Potential Options for Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *In Muscular Dystrophy* (pp. 349-380).
- Le Guen, Y. T., Le Gall, T., Laurent, V., d'Arbonne, F., Braun, S., & Montier, T.** (2021). Dystrophie musculaire de Duchenne : état actuel et perspectives thérapeutiques. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 205(5), 509-518.

- Le Hir, M., Goyenvalle, A., Peccate, C., Précigout, G., Davies, K. E., Voit, T., & Lorain, S.** (2013). AAV genome loss from dystrophic mouse muscles during AAV-U7 snRNA-mediated exon-skipping therapy. *Molecular Therapy*, 21(8), 1551-1558.
- Le Rumeur, E** (2015). Dystrophin and the two related genetic diseases, Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 15(3), 14.
- Le Rumeur, E., Winder, S. J., & Hubert, J. F.** (2010). Dystrophin: more than just the sum of its parts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(9), 1713-1722.
- Leturcq, f, et j. C. Kaplan.** (2000). Le diagnostic étiologique des dystrophies musculaires récessives. *La Lettre du Neurologue*, 4(5), 250-58.
- Leturcq, F., & Tuffery-Giraud, S.** (2015). Aspects génétiques et moléculaires des dystrophinopathies. *Archives de pédiatrie*, 22(12), 12S3-12S11.
- Leturcq, F., Nectoux, J.** (2018). Les dystrophinopathies. Association des Praticiens de Génétique Moléculaire. 9p.
- Li, S., Kimura, E., Fall, B. M., Reyes, M., Angello, J. C., Welikson, R., Chamberlain, J. S.** (2005). Stable transduction of myogenic cells with lentiviral vectors expressing a minidystrophin. *Gene therapy*, 12(14), 1099-1108.
- Luce, L., Carcione, M., Mazzanti, C., Buonfiglio, P. I., Dalamón, V., Mesa, L., & Giliberto, F.** (2021). Theragnosis for Duchenne muscular dystrophy. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 648390.
- Lütschg, J.** (2018). La dystrophie musculaire de Duchenne : la lumière au bout d'un tunnel sombre. *Neuropédiatrie*, 18(0102) : 22-25.
- Magot, A., Mercier, S., & Péréon, Y.** (2015). Particularités de la dystrophie musculaire de Becker et des femmes conductrices. *Archives de Pédiatrie*, 22(12), 12S31-12S36.
- Marieb. N.** (2005). *Muscles et tissu musculaire*, Pearson Education, Anatomie et physiologie humaines, 6^{ème} éd, Canada, Page 286- 396.
- Marieb. N.** (2008). *Les cellules et les tissus*, Pearson Education, Biologie humaine Principes d'anatomie et de physiologie, 8^{ème} éd, Canada, Page 176-218.

- Mattei, J. P., d'Agostino, M. A., Le Fur, Y., Guis, S., Cozzone, P., & Bendahan, D.** (2008). Apport du scanner, de l'échographie et de l'IRM dans la pathologie musculaire de l'adulte. *Revue du rhumatisme*, 75(2), 118-125.
- Mcintosh, L. M., Baker, R. E., & Anderson, J. E.** (1998). Magnetic resonance imaging of regenerating and dystrophic mouse muscle. *Biochemistry and Cell Biology*, 76(2-3), 532-541.
- Mercuri E, Muntoni F, Osorio AN, Tulinius M, Buccella F, Morgenroth LP, et al.** (2020). Safety and effectiveness of ataluren: Comparison of results from the STRIDE Registry and CINRG DMD. *Natural History Study*, 9 :341–360.
- Meyers, T. A., & Townsend, D.** (2019). Cardiac pathophysiology and the future of cardiac therapies in Duchenne muscular dystrophy. *International journal of molecular sciences*, 20(17), 4098.
- Miyatake, S., Shimizu-Motohashi, Y., Takeda, S. I., & Aoki, Y.** (2016). Anti-inflammatory drugs for Duchenne muscular dystrophy: focus on skeletal muscle-releasing factors. *Drug design, development and therapy*, 2745-2758.
- Morgan, J., & Muntoni, F.** (2021). Changes in Myonuclear Number During Postnatal Growth—Implications for AAV Gene Therapy for Muscular Dystrophy. *Journal of Neuromuscular Diseases*, 8(s2), S317-S324.
- Muntoni, F., Torelli, S., & Ferlini, A.** (2003). Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *The Lancet Neurology*, 2(12), 731-740.
- Mzabi, A., Lazrek, I., Baya, W., Anoun, J., Hassine, I. B., Kermani, M., & Laouani, C.** (2022). Dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale. *La Revue de Médecine Interne*, 43, A477-A478.
- Nakamura, A.** (2019). Mutation-based therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy : from genetic diagnosis to therapy. *Journal of personalized medicine*, 9(1), 16.
- Nakamura, A., & Takeda, S. I.** (2009). Exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuropathology*, 29(4), 494-501.
- Nicolas, A.** (2012). Etude in silico de dystrophines tronquées dans les myopathies de Duchenne et de Becker. Thèse doctorat, Université de Rennes.
- Ostrovidov S, Hosseini V, Ahadian S, Fujie T, Parthiban SP, Ramalingam M, Bae H, Kaji H, Khademhosseini A.** (2014). Skeletal muscle tissue engineering: methods to form skeletal myotubes and their applications. *Tissue Eng Part B Rev*, 20(5), 403-36.

- Pasha, S. F. A., Fatima, W., Srinivasamurthy, S. K.** (2022). Gene Therapies for Spinal Muscular Atrophy and Duchenne Muscular Dystrophy: A Pathbreaking Moment in Therapeutics. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 34(53B), 15-35.
- Passarge Eberhard.** (2008). Maintien de la structure cellulaire et tissulaire, Médecine-Science Flammarion, Atlas de poche de génétique, 3^{ème} éd, France, 374-384.
- Percival, J. M.** (2011). Nnos regulation of skeletal muscle fatigue and exercise performance. *Biophysical reviews*, 3, 209-217.
- Péréon, Y., Mercier, S., & Magot, A.** (2015). Physiopathologie de la dystrophie musculaire de Duchenne. *Archives de pédiatrie*, 22(12), 12S18-12S23.
- Pichavant, C.** (2010). Thérapie génique de la dystrophie musculaire de Duchenne. Thèse de doctorat, université Laval Québec.
- Piga, D., Salani, S., Magri, F., Brusa, R., Mauri, E., Comi, G. P., & Corti, S.** (2019). Human induced pluripotent stem cell models for the study and treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 12.
- Pioner, J. M., Guan, X., Klaiman, J. M., Racca, A. W., Pabon, L., Muskheli, V., Regnier, M.** (2020). Absence of full-length dystrophin impairs normal maturation and contraction of cardiomyocytes derived from human-induced pluripotent stem cells. *Cardiovascular research*, 116(2), 368-382.
- Pradeep, S. P., Malik, S., Slack, F. J., Bahal, R.** (2023). Unlocking the potential of chemical lymodified peptide nucleic acids for RNA-based therapeutics. *RNA*, 29(4), 434-445.
- Prat, F.** (2020). Les solutions pour prévenir de la génotoxicité du système CRISPR-Cas9, Doctoral dissertation, Université de Bordeaux.
- Protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDS).** (2019). Dystrophie musculaire de Duchenne.
- Ricci G, Bello L, Torri F, Schirinzi E, Pegoraro E, Siciliano G.** (2022). Therapeutic opportunities and clinical outcome measures in Duchenne muscular dystrophy. *Neurol Sci*. 43(Suppl 2), 625-633.
- Rivier F, U. Walther -Louvier, M. Mecier, S. Chabrier, B. Echenne, G. Hugon, B. Couette, K. Hania, D. Mornet.** (2010). De la dystrophine aux dystrophinopathies. Elsevier Masson, Dystrophinopathies de l'enfant et de l'adulte, France, page 1-7.

- Shieh, P. B.** (2018). Emerging strategies in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Neurotherapeutics*, 15(4), 840-848.
- Sinnreich .M** (2010). Dystrophinopathies. *Disorders of voluntary muscle*, 205-229
- Starosta, A., & Konieczny, P. (2021).** Therapeutic aspects of cell signaling and communication in Duchenne muscular dystrophy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78, 4867-4891.
- Stein C. A.** (2016). Eteplirsén Approved for Duchenne Muscular Dystrophy: The FDA Faces a Difficult Choice. *Molecular therapy: Journal of the American Society of Gene Therapy*, 24(11), 1884–1885.
- Sun, C., Shen, L., Zhang, Z., & Xie, X.** (2020). Therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy: an update. *Genes*, 11(8), 837.
- Torrente, Y., Tremblay, J. P., Pisati, F., Belicchi, M., Rossi, B., Sironi, M., & Bresolin, N.** (2001). Intraarterial injection of muscle-derived CD34+ Sca-1+ stem cells restores dystrophin in mdx mice. *The Journal of cell biology*, 152(2), 335-348.
- Tortora Gerard J., Bryan Derrickson.** (2009). Muscular Tissue. John Wiley & Sons, Inc. Éd 12^e.the United States of America. Principles of anatomy and physiology. Page 302-336.
- Traverso, M., Malnati, M., Minetti, C., Regis, S., Tedeschi, S., Pedemonte, M., & Zara, F.** (2006). Multiplex real-time PCR for detection of deletions and duplications in dystrophin gene. *Biochemical and biophysical research communications*, 339(1), 145-150.
- Tselikas, L., Rodrigues, E., Jammal, M., Tiev, K., Chayet, C., Josselin-Mahr, L., & Kettaneh, A.** (2010). Late onset Becker muscular dystrophy. A case report and literature review. *La Revue de Médecine Interne*, 32(3), 181-186.
- Tuffery-Giraud, S., Bérout, C., Leturcq, F., Yaou, R. B., Hamroun, D., Michel-Calemard, L., & Claustres, M.** (2009). Genotype–phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD–DMD database: a model of nation-wide knowledge base. *Human mutation*, 30(6), 934-945.
- Van Westering, T. L., Betts, C. A., & Wood, M. J.** (2015). Current understanding of molecular pathology and treatment of cardiomyopathy in duchenne muscular dystrophy. *Molecules*, 20(5), 8823-8855.
- Verhaart, I. E., & Aartsma-Rus, A.** (2019). Therapeutic developments for Duchenne muscular dystrophy. *Nature Reviews Neurology*, 15(7), 373-386.

- Wagner, K. R., Kuntz, N. L., Koenig, E., East, L., Upadhyay, S., Han, B., & Shieh, P. B.** (2021). Safety, tolerability, and pharmacokinetics of casimersen in patients with Duchennemuscular dystrophy amenable to exon 45 skipping: A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-titration trial. *Muscle & Nerve*, 64(3), 285-292.
- Wahbi, K.** (2015). Aspects cardiologiques des dystrophinopathies. *Archives de Pédiatrie*, 22(12), 12S37-12S41.
- Wattin, M.** (2017). Modulation des mécanismes de contrôle qualité des protéines dans la dystrophie musculaire de Duchenne, Thèse de Doctorat, Université de Lyon.
- Wilson, K., Faelan, C., Patterson-Kane, J. C., Rudmann, D. G., Moore, S. A., Frank, D., & Milici, A. J.** (2017). Duchenne and Becker muscular dystrophies: à review of animal models, clinical end points, and biomarker quantification. *Toxicologic pathology*, 45(7), 961-976.
- Yao, S., Chen, Z., Yu, Y., Zhang, N., Jiang, H., Zhang, G., & Zhang, B.** (2021). Current pharmacological strategies for Duchenne muscular dystrophy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 689533.
- Yiu, E. M., & Kornberg, A. J.** (2015). Duchenne muscular dystrophy. *Journal of paediatrics and child health*, 51(8), 759-764.
- Zablocka, B., Górecki, D. C., & Zablocki, K.** (2021). Disrupted calcium homeostasis in duchenne muscular dystrophy: A common mechanism behind diverse consequences. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 11040.

Aspect moléculaire et cellulaire des dystrophinopathies et les nouvelles approches thérapeutiques

Résumé :

Les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker sont les formes les plus fréquentes et les plus progressives. Ce sont des troubles alléliques liés à X causés par des mutations de type délétion ou duplication du gène DMD localisé en Xp21.1, codant pour une protéine de 427KDa exprimée au niveau du sarcolemme, assure le lien entre le complexe protéique associée à la dystrophine et le sarcolemme et le cytosquelette pour maintenir la stabilité musculaire. La DMD est la forme la plus sévère résulte d'une mutation empêchant toute production de la protéine, alors que la forme légère et tardive est la BMD résulte de mutation compatible avec la synthèse d'une dystrophine anormale mais fonctionnelle. Des stratégies thérapeutiques visent à restaurer l'expression et/ou la fonction de la dystrophine, y compris les thérapies géniques, cellulaires et de remplacement des protéines et d'autres améliorent la fonction et la qualité musculaire en ciblant les changements pathologiques en aval, notamment l'inflammation, la fibrose et l'atrophie musculaire. Des nouvelles approches thérapeutiques sont actuellement explorées, offrant des nouvelles perspectives et espoirs dans la prise en charge de cette grave maladie.

Mots-clés : dystrophies musculaires de Duchenne/Becker, gène DMD, protéine dystrophine, mutation, thérapie génique, thérapie cellulaire.

Abstract:

Duchenne and Becker muscular dystrophies are the most frequent and progressive forms. They are X-linked allelic disorders caused by deletion or duplication mutations of the DMD gene located in Xp21.1, coding for a 427KDa protein expressed in the sarcolemma, linking the dystrophin-associated protein complex to the sarcolemma and cytoskeleton to maintain muscle stability. DMD is the most severe form, resulting from a mutation that prevents all production of the protein, while the mild, late form, BMD, results from a mutation compatible with the synthesis of an abnormal but functional dystrophin. Therapeutic strategies aim to restore dystrophin expression and/or function, including gene, cell and protein replacement therapies, while others improve muscle function and quality by targeting downstream pathological changes, including inflammation, fibrosis and muscle atrophy. New therapeutic approaches are currently being explored, offering new perspectives and hope in the management of this serious disease.

Keywords: Duchenne/Becker muscular dystrophies, DMD gene, dystrophin protein, mutation, gene therapy, cell therapy.

ملخص:

يعتبر الضمور العضلي دوشن وبيكر أكثر أشكال الضمور العضلي شيوعًا وتقدمًا، فهي اضطرابات أليلية مرتبطة بالكروموسوم X وناجمة عن طفرات الحذف أو التكرار لمورثة DMD الموجودة في Xp21.1، والذي يشكل بروتين يزن 427 كيلو دالتون المعبر عنه في غمد الليف العضلي، ويعمل على ربط مختلف المركبات البروتينية المرتبطة بالديستروفين بسطح الخلية والهيكل الخلوي للحفاظ على استقرار العضلات. الضمور العضلي دوشن هو الشكل الأكثر حدة و ينتج عن طفرة تمنع أي إنتاج للبروتين، بينما الضمور العضلي بيكر هو الشكل الأخر و ينتج عن طفرة تسمح بتخليق ديستروفين غير طبيعي ولكن وظيفي. تهدف الاستراتيجيات العلاجية إلى استعادة التعبير و / أو وظيفة الديستروفين، بما في ذلك العلاجات الجينية والخلوية واستبدال البروتينات، وغيرها من العلاجات التي تعمل على تحسين وظيفة العضلات وجودتها من خلال استهداف التغيرات وتحسين الحالة المرضية، مثل الالتهاب والتليف وضمور العضلات. لا تزال هناك حاجة إلى تحسينات لزيادة فعالية هذه العلاجات وأمانها على المدى الطويل ومنح الأمل للأشخاص المصابين بهذا المرض.

الكلمات المفتاحية: اعتلال العضلي دوشن/بيكر، مورثة DMD، بروتين ديستروفين، طفرة، علاج جيني، علاج خلوي