



Reçu le :  
1 juillet 2011  
Accepté le :  
21 juillet 2011  
Disponible en ligne  
14 octobre 2011

Disponible en ligne sur  
 **ScienceDirect**  
[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

## Perspectives thérapeutiques innovantes des maladies neuromusculaires

Innovative therapeutic prospects for neuromuscular diseases

S. Braun<sup>1</sup>

*Association française contre les myopathies (AFM), 1, rue de l'Internationale, BP 59, 91002 Évry cedex, France*

### Summary

Due to a number of characteristics, therapeutic approaches of neuromuscular diseases represent complex issues. Nevertheless, they help to set the ground for many innovative breakthroughs: gene therapy by way of transfer into the target muscle or neuronal cells of full-length or minimal coding sequences, ARN “surgery” (epi-surgery or stop codon readthrough), DNA surgery, transfer or induction of compensatory genes. In parallel to these gene-based strategies, the stimulation of tissue regeneration uses embryonic or iPS stem cells that can be administered into the blood stream, with the subsequent ability of extravasation and transdifferentiation. Tissue regeneration can also be obtained by chemical stimulation of endogenous stem cells. Alternatively, various pharmacological approaches are aiming at protecting neuronal, cardiac, or skeletal muscle cells from degradation. Future therapies will probably rely on combinations of targeted gene-based and non-selective regenerative and/or cytoprotective interventions.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Neuromuscular diseases, Gene therapy, Spliceotherapy, Cell graft, DNA correction, Pharmacology

### Résumé

Les maladies neuromusculaires sont particulièrement complexes à aborder d'un point de vue thérapeutique. Cependant, elles sont à l'origine de nombreuses pistes particulièrement innovantes : thérapie génique par transfert dans les cellules cibles musculaires ou neuronales de séquences codantes complètes ou partielles de gènes thérapeutiques, « chirurgie » de l'ARN (épissothérapie ou translecture de codons stop) ou de l'ADN, transfert ou induction d'autres gènes à visée thérapeutique. Parallèlement, la stimulation de la régénération tissulaire implique des cellules souches embryonnaires ou induites à la différenciation, qui, administrées dans la circulation sanguine, ont la capacité de migration hors des vaisseaux et de transdifférenciation. Elle peut être obtenue également par induction pharmacologique des cellules endogènes. Diverses approches pharmacologiques visent à protéger les cellules cibles musculaires, neuronales ou cardiaques de la dégradation. Les traitements futurs passeront probablement par une combinaison d'une thérapie spécifique génétique avec une thérapie non spécifique régénératrice et/ou cytoprotectrice.

© 2011 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Mots clés :** Maladies neuromusculaires, Thérapie génique, Spliceothérapie, Correction de l'ADN, Pharmacologie

**L**e traitement des maladies neuromusculaires se heurte à de nombreuses barrières :

- nécessité de corriger et préserver de manière durable l'ensemble du tissu cible (en particulier la musculature représentant la moitié de la masse de l'organisme) ;

e-mail : [sbraun@afm.genethon.fr](mailto:sbraun@afm.genethon.fr).

<sup>1</sup> PharmD, PhD, directeur scientifique de l'AFM.

- affections graves débutant dès l'enfance et évoluant vers la disparition progressive du tissu fonctionnel ;
- occurrence de nombreuses mutations de novo (un tiers des cas dans la dystrophie musculaire de Duchenne) induisant une variété considérable d'anomalies génétiques rendant chaque patient littéralement unique.

Ces stratégies thérapeutiques peuvent être catégorisées en thérapies issues de la connaissance des gènes et en thérapies cytoprotectrices et régénératrices.

## Thérapies issues de la connaissance des gènes

### Transfert de gènes

La thérapie génique est elle-même multiforme : transfert de la séquence codante complète ou partielle du gène sain, chirurgie de l'acide ribonucléique (ARN) ou de l'acide désoxyribonucléique (ADN), transfert ou induction d'autres gènes à visée thérapeutique. La première tentative clinique a porté sur la dystrophie musculaire de Duchenne. Elle a consisté à administrer la séquence codante complète du gène de la dystrophine, porté par un vecteur non-viral, l'ADN plasmidique. Dans l'essai de phase I réalisé en 2001 à 2003, une dose faible de vecteur a été utilisée (600 µg) conduisant à une expression très faible et locale (le long du trajet de l'aiguille) de dystrophine et sans pouvoir totalement exclure une réponse immune en cas de dose massive de vecteur. L'administration HLV (*hydrodynamic limb vein*) de plasmide dans les membres, mise au point chez les primates et les modèles rongeurs (souris mdx) et canin (chien GRMD) de dystrophie musculaire de Duchenne, se révèle efficace et bien tolérée. Elle permet de délivrer de grandes quantités de plasmide (jusqu'à plusieurs centaines de mg) par voie intra-veineuse en s'aidant d'un garrot gonflable (tourniquet) à la racine du membre pour délimiter ainsi la zone traitée. Tous les patients pourraient bénéficier de cette approche. L'efficacité de transfection chez le primate apparaît importante (40 % des fibres dans certains muscles) mais pourrait être encore améliorée. Cela est possible grâce aux vecteurs viraux tels que les AAV. Ces virus ne pouvant accommoder la séquence codante complète de la dystrophine, des versions minimales du gène ont été générées et capables de corriger le phénotype dystrophique des divers modèles de souris mdx et chez le chien GRMD. Un essai clinique de sécurité (phase I randomisée en double-insu) après administration intramusculaire d'un AAV2.5-minidystrophine (BioStrophin®) est en cours chez des patients âgés de cinq à 11 ans. À ce jour et après deux ans pour les premiers patients, aucun effet indésirable grave n'a été observé. Une expression faible locale de minidystrophine a été mise en évidence chez deux des six patients. La voie d'administration locorégionale HLV d'AAV est également envisagée. Des études chez le rongeur, le chien GRMD et le primate non-humain sont en cours, ainsi qu'une étude clinique d'administration HLV de tampon salin chez des volontaires atteints de dystrophie musculaire de Duchenne. D'autres applications, notamment visant des myopathies des ceintures (alpha ou gamma sarco-glycanopathies en particulier) sont d'ores et déjà envisagées (des essais de phase I d'injections locales se sont récemment achevés).

Différents obstacles subsistent : techniques (production grande échelle de vecteur mais en cours de résolution) ou scientifiques, en particulier contrôle de la neutralisation

anti-vecteur surtout chez les sujets séropositifs pour les AAV, ou anti-transgène (possible selon les patients).

### Chirurgie de l'acide désoxyribonucléique

Les risques d'intégrations aléatoires de vecteurs ont amené à évaluer une nouvelle voie de recherche que l'on pourrait qualifier de chirurgie de l'ADN ciblée. Des méganucléases sont aujourd'hui expérimentées pour la dystrophie musculaire de Duchenne et d'autres myopathies. Les méganucléases dérivent d'endonucléases naturelles qui créent une coupure double brin dans la séquence cible sur le chromosome. À l'aide d'une matrice ADN apportant la séquence d'intérêt, il est alors possible, par le biais de l'évènement de recombinaison homologue, d'induire la réparation par la machinerie nucléaire. On peut ainsi s'adresser à toutes sortes de mutations génétiques humaines, certaines validées in vitro. Diverses myopathies sont actuellement explorées. Si l'on entrevoit assez rapidement la possibilité de correction de cellules in vitro dans une perspective de thérapie cellulaire ciblée, les applications in vivo se heurtent encore aux mêmes problématiques de vectorisation que la thérapie génique.

Une alternative consiste à agir, non à l'échelle de l'ADN, mais plus en aval, sur le produit du gène. Le plus souvent les mutations génétiques débouchent sur un codon stop produisant les formes sévères liées aux mutations « nulles » ou abolissant le cadre de lecture empêchant toute production de dystrophine. Les formes plus modérées résultent de mutations qui respectent le cadre de lecture et sont compatibles avec la production d'une dystrophine plus courte pouvant conserver une certaine fonctionnalité. Ce concept a été approfondi expérimentalement chez la souris où on a pu étudier l'impact sur la fonction musculaire de toute une série de délétions de taille croissante.

### Chirurgie de l'acide ribonucléique

#### Saut d'exon

Il a donc été envisagé de modifier l'épissage de l'ARN pré-messager par saut d'exons afin d'en restaurer le cadre de lecture, phénomène naturel décrypté dans les fibres musculaires de malades atteints de dystrophie musculaire de Duchenne dites « révertantes ». Ainsi, des oligonucléotides antisens complémentaires des séquences-clés de l'épissage et chimiquement modifiés pour les rendre insensibles aux RNases permettent la production de dystrophine tronquée chez des malades où le déficit est complet, c'est-à-dire de transformer une myopathie de type dystrophie musculaire de Duchenne en type BMD. Cette méthode « d'épissothérapie » devrait en théorie corriger un grand nombre de cas de décalage du cadre de lecture, ou de mutations non-sens, par le choix judicieux de l'exon ou des exons à éliminer. La persistance de l'effet thérapeutique est obtenue par administrations répétées des oligonucléotides antisens (leur demi-vie dans la cellule n'excède pas quelques

semaines) ou par la vectorisation de séquences productrices de ces antisens dans un AAV ou un lentivirus. La première tentative chez l'homme a consisté à administrer par voie intraveineuse 0,5 mg/kg de manière hebdomadaire pendant quatre semaines d'un antisens phosphorothioate destiné à sauter l'exon 19 chez un patient de dix ans atteint de dystrophie musculaire de Duchenne présentant une délétion de l'exon 20. Bien que faible, la présence dans les lymphocytes sanguins du messenger en phase sauté des exons 19 et 20, ainsi que des traces de dystrophine dans une biopsie musculaire ont été observés une semaine après la dernière injection.

Deux autres molécules ciblant l'exon 51 sont au stade des essais de phase IIb :

- le PRO051 développé par la société Prosensa a montré dans deux essais une expression dose-dépendant de quasi-dystrophine dans les biopsies musculaires à distance. Aucune réponse immune anti-dystrophine n'a été observée. Un suivi long terme des patients est en cours. Un essai de phase IIb visant l'exon 51 et un essai de phase I/II ciblant l'exon 44 sont en cours ;
- AVI BioPharma, développe un morpholino réputé plus stable chimiquement que les phosphorothioates, l'AVI-4658. Après de bons résultats chez le chien GRMD, les données d'essais cliniques d'injections intramusculaires puis intraveineuses montrent une forte expression de quasi-dystrophine également dépendante de la dose chez des patients ambulants âgés de cinq à 15 ans.

Le saut d'exon doit être adapté aux caractéristiques génétiques précises de chaque patient. Une autre limitation est représentée par l'incapacité relative de ces produits à cibler le cœur (sauf peut-être pour les AAV-U7 ou U1 à condition que des méthodes adéquates d'administration soient disponibles). Une grande proportion de malades n'est pas éligible au saut d'exons, car certaines parties de la protéine ne doivent pas être délétées. De surcroît, chaque oligonucléotide antisens étant considéré comme un nouveau médicament en soit, il devient indispensable d'adapter les contraintes réglementaires pour faciliter leur développement et leur accessibilité aux mutations rares. Parallèlement, des stratégies antisens destinées à interférer avec l'expression d'ARN sont également développées pour d'autres maladies neuromusculaires (dystrophinopathies, dystrophie myotonique de Steinert et plus généralement toutes pathologies à répétitions de triplets pour lesquelles l'accumulation d'un ARN « anormal » se révèle toxique).

### Translecture forcée des codons stop

Cette autre stratégie d'épissothérapie permet de court-circuiter les codons stop prématurés induits par une mutation non-sens (environ 10 % des cas de dystrophie musculaire de Duchenne). Le principe, découvert à l'occasion d'effets inattendus d'aminoglycosides antibiotiques, a été développé autour de molécules non antibiotiques comme le PTC124® (Ataluren), qui est actuellement en essai clinique de phase III

dans la dystrophie musculaire de Duchenne et la mucoviscidose. Se pose ici le problème de la spécificité d'action du produit qui doit respecter non seulement les stops naturels signalant la fin de la protéine, mais aussi les très nombreux stops prématurés engendrés par des épissages alternatifs aléatoires. Un suivi long terme des patients traités est à ce titre indispensable. Dix pour cents des maladies génétiques sont éligibles.

Il est possible que pour les patients dont la maladie est déjà très évoluée, ces différentes pistes se révèlent insuffisantes, du fait notamment de la fonte musculaire (dès que les capacités régénératrices du muscle sont dépassées ou épuisées) au profit de la fibrose et de l'adipose. Une stratégie régénératrice pourrait permettre de contourner ce problème.

## Thérapies régénératrices

### Cellules souches

#### Injections de cellules souches

Le principe consiste à délivrer dans la musculature un nombre suffisant de cellules souches à visée myogénique. Les premiers essais cliniques basés sur la greffe par injections locales de myoblastes, cellules souches adultes musculaires, se sont révélés décevants. Les myoblastes contribuent à la réparation musculaire dans le muscle normal et pathologique. La greffe de myoblastes sains permet de surcroît la production de dystrophine dans les muscles greffés chez la souris mdx. Les multiples essais cliniques entrepris alors n'ont cependant pas permis de démontrer le gain fonctionnel attendu, du fait notamment du rejet des cellules greffées ou de la dystrophine produite, du nombre limité de divisions cellulaires des cellules purifiées, de leur forte mortalité après injection et de leur absence de diffusion dans les muscles injectés.

De nombreux autres types cellulaires ont été identifiés qui pourraient résoudre une partie de ces difficultés, dérivant en particulier de multiples régions de l'organisme et souvent dans la zone vasculaire dont le type cellulaire peut être caractérisé par une collection de marqueurs membranaires : cellules satellites, cellules souches dérivées du muscle, side population, cellules souches dérivées de la moelle osseuse, mésoangioblastes, cellules souches CD133+ dérivées du sang ou du muscle et péricytes. Les mésoangioblastes et les CD133+ administrés dans la circulation sanguine ont la capacité de migration hors des vaisseaux et de transdifférenciation en cellules musculaires squelettiques et vasculaires chez les sujets atteints de dystrophie musculaire de Duchenne. Les CD133+ circulants pourraient même constituer un biomarqueur formes modérées de la dystrophie musculaire de Duchenne. Ces cellules pourraient être prélevées chez les malades eux-mêmes et être génétiquement modifiées comme cela a été montré pour le saut d'exon avec des constructions lentivirales, limitant ainsi le risque immunologique.

### Induction pharmacologique de la régénération musculaire

L'utilisation de facteurs de croissance myotrophiques (IGF1, hormone de croissance par exemple) a été proposée. Plus récemment des données encourageantes ont été obtenues en ciblant la voie de la myostatine. La myostatine est un régulateur négatif de la croissance musculaire. Les mutations spontanées dans le gène de la myostatine produisent un phénotype hypermusclé dans diverses espèces bovines, ovines, tout comme l'inactivation de ce gène chez la souris. Une mutation a été découverte dans une famille allemande, produisant une même hypertrophie musculaire et une force peu commune chez l'homme. Ainsi, un anticorps monoclonal anti-myostatine a été évalué dans un essai de phase I/II dans trois maladies neuromusculaires dont la BMD et un essai de phase II a débuté sur des malades atteints de dystrophie musculaire de Duchenne traités avec une protéine de fusion antagoniste de la liaison de la myostatine à son récepteur Activine II. D'autres inhibiteurs candidats sont au stade de la recherche animale : transfert du gène du propeptide MPRO chez le chien GRMD, de la follistatine ou de la *growth and differentiation factor-associated serum protein-1* (GASP-1). La voie anti-myostatine et la cytothérapie pourraient se combiner. Ainsi les anti-myostatines pourraient favoriser la différenciation myogéniques des cellules souches mésenchymateuses.

Cette voie pourrait être utilisée seule ou préférentiellement en combinaison avec une thérapie correctrice de l'atteinte génétique.

### Cytoprotection ou régénération des motoneurones

La cytoprotection et/ou la régénération des motoneurones par des cellules embryonnaires ou des iPS induites à la différenciation fait l'objet d'une recherche intense, mais qui n'en est encore qu'à un stade très précoce. Le remplacement cellulaire suppose la capacité des cellules greffées (d'origine embryonnaires ou iPS) à intégrer et former de nouvelles connections fonctionnelles avec les cellules hôtes. Dans le cas de l'amyotrophie spinale, les motoneurones ainsi greffés ou obtenus doivent être capables de former des prolongements axonaux étendus depuis la moelle épinière jusqu'à la plaque motrice (jusqu'à un mètre !). Cette gageure est possible à l'échelle du petit animal mais semble peu probable chez les primates. On s'oriente plutôt vers une stratégie de support neurotrophique apporté par les cellules elles-mêmes ou après modification génétique.

### Stratégies cytoprotectrices

Ciblées sur des protéines secondairement impliquées dans la cascade physiopathologique de la déficience génétique, de nombreuses pistes sont à l'étude. Parmi les protéines qu'il faudrait moduler (par inhibition ou stimulation) figurent l'utrophine, une protéine proche structurellement de la dystrophine. La surexpression d'utrophine chez les patients

atteints de myopathie de Duchenne est un phénomène naturel, peut-être compensateur, et que différents groupes cherchent à amplifier pharmacologiquement (ou par thérapie génique) pour obtenir un effet protecteur des cellules musculaires.

D'autres cibles sont les protéines du complexe lié à la dystrophine, d'autres protéines de la membrane musculaire, notamment l'intégrine alpha 7, l'inhibition de protéases, de signaux de stress ou de protéines agissant sur les mouvements de calcium ou les anti-fibrotiques. De nouvelles cibles pharmacologiques, issues de la connaissance de plus en plus précise des mécanismes moléculaires, se rapprochent de la clinique. C'est le cas en particulier des inducteurs de SMN2, protéine semi-fonctionnelle susceptible de compenser l'absence de SMN1 responsable de l'amyotrophie spinale infantile. Ces molécules pharmacologiques peuvent stimuler sélectivement le gène *smn2*, stabiliser son messenger ou la protéine produit du gène *smn2*.

La pharmacothérapie représente donc une voie importante à poursuivre. Les seuls traitements approuvés pour la dystrophie musculaire de Duchenne/DMB sont :

- les glucocorticoïdes dont l'effet retardateur de la destruction musculaire semble maintenant reconnu tant chez les malades ambulants que non-ambulants bien que les mécanismes n'en sont pas encore complètement élucidés (anti-inflammatoires, inducteurs de la régénération musculaire, inducteurs d'utrophine, inhibiteurs de protéases) et ;
- les cardioprotecteurs (inhibiteurs de l'enzyme de conversion,  $\beta$ -bloquants et plus récemment l'idébénone) qui permettent de réduire considérablement l'incidence et l'ampleur de l'insuffisance cardiaque.

L'analyse du transcriptome pathologique pourrait permettre de fournir de nouvelles pistes thérapeutiques. D'ores et déjà plusieurs dizaines de molécules et suppléments alimentaires sont proposés et se pose notamment la question du nombre d'essais cliniques et donc de patients disponibles pour leur validation.

### Conclusion

Les maladies neuromusculaires sont particulièrement complexes à aborder d'un point de vue thérapeutique. Cependant, elles sont à l'origine de nombreuses pistes particulièrement innovantes : thérapie génique par transfert dans les cellules cibles musculaires ou neuronales de séquences codantes complètes ou partielles de gènes thérapeutiques, « chirurgie » de l'ARN (épissothérapie ou translecture de codons stop) ou de l'ADN, transfert ou induction d'autres gènes à visée thérapeutique. Parallèlement, la stimulation de la régénération tissulaire implique des cellules souches embryonnaires ou induites à la différenciation, qui, administrées dans la circulation sanguine, ont la capacité de migration hors des vaisseaux et de

transdifférenciation. Elle peut être obtenue également par induction pharmacologique des cellules endogènes. Diverses approches pharmacologiques visent à protéger les cellules cibles musculaires, neuronales ou cardiaques de la dégradation. Les traitements futurs passeront probablement par une combinaison d'une thérapie spécifique génétique avec une thérapie non spécifique régénératrice et/ou cytoprotectrice.

## Déclaration d'intérêts

L'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

## Pour en savoir plus

Aartsma-Rus A, Van Deutekom JC, Fokkema IF, Van Ommen GJ, Den Dunnen JT. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 2006;34:135–44.

Braun S. Muscular gene transfer using nonviral vectors. *Curr Gene Ther* 2008;8:391–405.

Mendell JR, Campbell K, Rodino-Klapac L, Sahenk Z, Shilling C, Lewis S, et al. Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 2010;63:1429–37.

Arnould S, Perez C, Cabaniols JP, Smith J, Gouble A, Grizot S, et al. Engineered I-Crel derivatives cleaving sequences from

the human XPC gene can induce highly efficient gene correction in mammalian cells. *J Mol Biol* 2007;371:49–65.

Goyenvalle A, Vulin A, Fougere F, Leturcq F, Kaplan JC, Garcia L, et al. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 2004;306:1796–9.

van Ommen GJ, van Deutekom J, Aartsma-Rus A. The therapeutic potential of antisense-mediated exon skipping. *Curr Opin Mol Ther* 2008;10:140–9.

Peltz SW, Welch EM, Jacobson A, Trotta CR, Naryshkin N, Sweeney HL, et al. Nonsense suppression activity of PTC124 (ataluren). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:E64.

Farini A, Razini P, Erratico S, Torrente Y, Meregalli M. Cell based therapy for Duchenne muscular dystrophy. *J Cell Physiol* 2009;221:526–34.

Marchesi C, Belicchi M, Meregalli M, Farini A, et al. Correlation of circulating CD133+ progenitor subclasses with a mild phenotype in Duchenne muscular dystrophy patients. *PLoS One* 2008;3:e2218.

Lee SJ. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:61–86.

Shababi M, Mattis VB, Lorson CL. Therapeutics that directly increase SMN expression to treat spinal muscular atrophy. *Drug News Perspect* 2010;23:475–82.

Manzur AY, Kuntzer T, Pike M, Swan A. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;1:CD003725.

Duboc D, Meune C, Pierre B, Wahbi K, Eymard B, Toutain A, et al. Perindopril preventive treatment on mortality in Duchenne muscular dystrophy: 10 years' follow-up. *Am Heart J* 2007;154:596–602.