

Calpaïne 3 et dystrophie musculaire des ceintures de type 2A

La dystrophie musculaire des ceintures de type 2A (LGMD2A pour *limb girdle muscular dystrophy*, MIM253600) est une maladie autosomique récessive caractérisée par une atrophie symétrique des muscles des ceintures pelvienne et scapulaire, une élévation de la concentration sérique de créatine kinase et un aspect de nécrose-régénération sur les biopsies

musculaires. Dans la majorité des cas, les symptômes apparaissent dans l'enfance et s'aggravent progressivement jusqu'à la perte de la marche en 10 à 20 ans [1]. Le gène impliqué dans la forme LGMD2A, identifié par clonage positionnel (*m/s* 1995, n° 11, p. 637), code pour la calpaïne 3, une enzyme spécifique du muscle squelettique, faisant partie de la famille des

protéases du calcium à cystéine, dépendantes du calcium (pour revue voir [2]). A l'heure actuelle, une centaine de mutations différentes ont été observées dans le gène de la calpaïne 3. Leur nature permet d'incriminer une déficience en cette enzyme dans la symptomatologie observée. Le gène codant pour la calpaïne 3 humaine (CAPN3) couvre une région

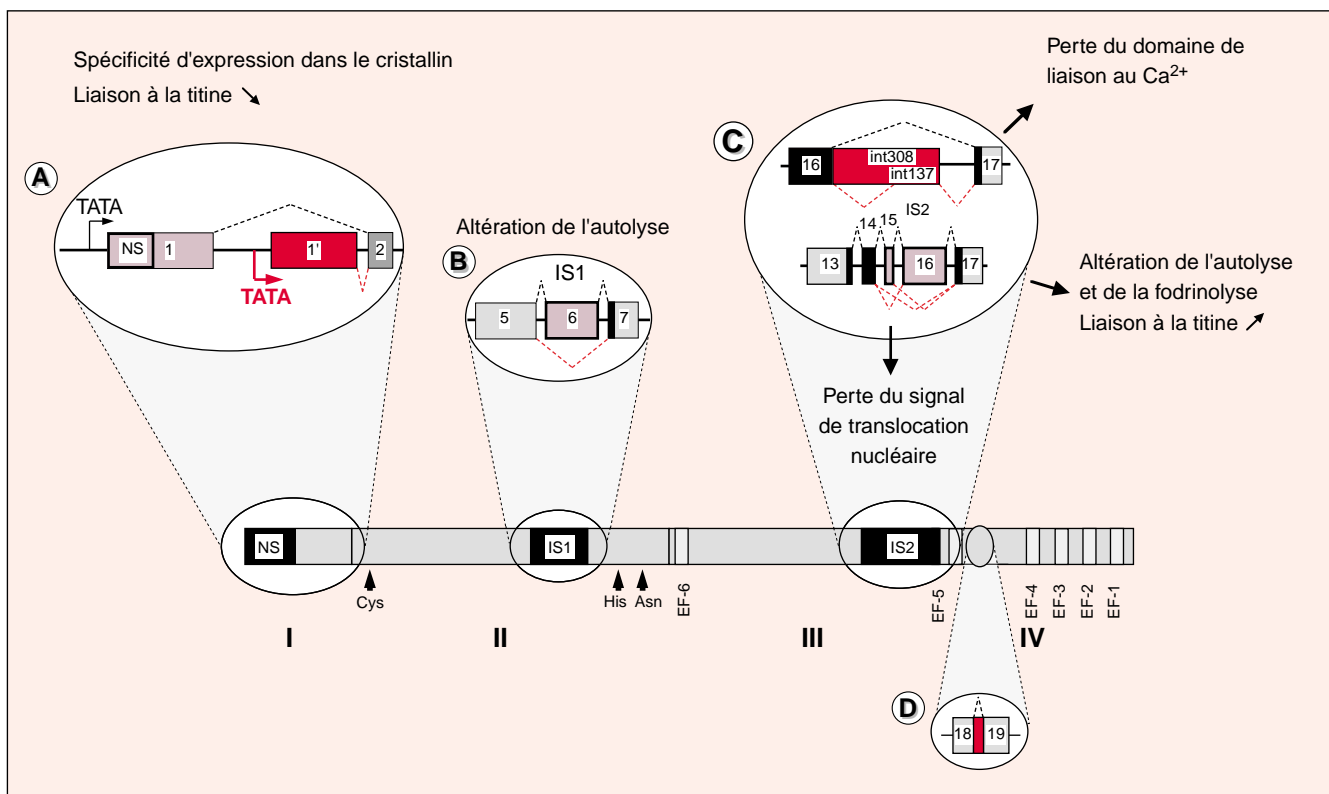


Figure 1. **Structure schématique de la calpaïne 3 et détails des événements d'épissage alternatif qui affectent son gène.** Sont représentés les quatre domaines protéiques I, II, III et IV de la calpaïne 3 ainsi que ses trois régions spécifiques: NS, IS1 et IS2 (en noir). Les épissages courants sont représentés en pointillés noirs, les épissages alternatifs, en pointillés rouges. Les exons de la calpaïne 3 classique, soumis à épissage alternatif, sont représentés en bistre et indiqués par leur numéro respectif; les séquences introniques retenues sont en rouge. **A**: premier exon alternatif transcrit à partir d'un deuxième promoteur; **B**: délétion de l'exon 6; **C**: délétion des exons 15 et/ou 16 et rétention des séquences int308 ou int137; **D**: rétention de l'intron 18. Abréviations des trois résidus du site actif protéolytique: Cys, cystéine; His, histidine; Asn, asparagine; EF-1 à 6: les structures liant le Ca²⁺.

d'environ 40 kb (*m/s* 1995, n° 11, p. 637). Il est exprimé principalement dans le muscle squelettique sous la forme d'un transcrit de 3,5 kb, codant pour une protéine de 94 kDa. Cette dernière comporte, comme les autres calpaïnes, 4 domaines: un domaine protéolytique, un domaine de liaison au calcium, et deux domaines sans homologie connue [3]. On identifie aussi trois courtes régions spécifiques de la calpaïne 3 (NS, IS1 et IS2) localisées, respectivement, dans la région amino-terminale, dans le domaine protéolytique et entre les domaines III et IV (*figure 1*). La région IS2 comprend un signal de localisation nucléaire [3] et un site de liaison à la titine (ou connectine) ([4] et *m/s* 1997, n° 10, p. 1189), une protéine élastique s'étendant sur la moitié d'un sarcomère.

Sorimachi *et al.* ont montré que lorsqu'elle est exprimée dans les cellules COS-7, la calpaïne 3 subit une dégradation autolytique immédiatement après sa traduction, réaction qui met en jeu la région IS2 [5]. La calpaïne 3 sauvage, dans les cellules COS-7, exprime aussi une activité

protéolytique vis-à-vis de la sous-unité intrinsèque α de 230 kDa de la fodrine, ce qui produit un fragment de 150 kDa [6].

Nos connaissances sur la fonction, les modalités de régulation et les substrats physiologiques de la calpaïne 3 demeurent, cependant, très incomplètes et ne permettent pas de comprendre, au niveau moléculaire, comment une déficience en cette enzyme protéolytique peut conduire à un processus dystrophique. Nous avons donc engagé des travaux visant à mieux cerner le rôle de la calpaïne 3, en insistant tout particulièrement sur l'étude, d'une part, de la régulation de son expression et, d'autre part, de son implication possible dans le contrôle de l'apoptose.

Expression de la calpaïne 3 au cours du développement

Nous avons démontré qu'il existe des différences majeures dans l'expression tissulaire de la calpaïne 3 entre l'homme et la souris (*figure 2*). Par ailleurs, si cette protéine est connue pour être spécifique du muscle sque-

lettique, le gène est transcrit dans le cœur et le muscle lisse humain, et le cristallin murin. Ces expériences ont été réalisées par hybridation *in situ* (HIS) sur des coupes d'embryons humains ou murins, à divers stades de l'embryogenèse, en utilisant des sondes oligonucléotidiques issues de régions spécifiques du gène de la calpaïne 3 (NS dans l'exon 1, IS1 dans l'exon 6 et IS2 dans l'exon 16), ainsi qu'une sonde reconnaissant la région 3' non traduite du transcrit. Ces expériences permettent la mise en évidence globale des transcrits sans pour autant pouvoir qualifier précisément leur nature moléculaire.

Chez l'homme, ces 4 sondes détectent les ARN de la calpaïne 3 dans l'ensemble des compartiments cardiaques, et ce dès la fin de la troisième semaine de développement. A partir de la 6^e semaine de développement l'expression se restreint aux oreillettes puis disparaît chez l'adulte. En revanche, dans le muscle squelettique humain, l'apparition des transcrits de CAPN3 (détectés par HIS) est tardive, à la 8^e semaine de développement, c'est-à-dire à la fin de la période embryonnaire [7]. Enfin, seules les sondes issues des régions IS2 et 3' ont permis la détection de transcrits dans le tractus digestif à partir de la 8^e semaine de développement [8]. Il faut noter cependant qu'une analyse par *Western blot* utilisant des anticorps monoclonaux (Dr L. Anderson, Newcastle, GB) ne détecte la protéine qu'après la 13^e semaine de développement et ce uniquement dans le muscle squelettique.

Chez la souris, les quatre sondes révèlent les messagers de la calpaïne 3 dans le système musculaire squelettique: à jour 13,5 après conception pour les membres supérieurs et à jour 14,5 pour les membres inférieurs. Dans cette espèce, contrairement à l'homme, aucune expression n'a pu être mise en évidence dans le tissu cardiaque et le muscle lisse. En revanche, de forts signaux sont également détectés dans le cristallin dès le jour 12,5 et persistent jusqu'après la naissance, hormis pour la sonde issue de la région NS, qui ne détecte aucun transcrit du cristallin (*voir plus loin*) [9].

Cette différence dans les profils d'expression de la calpaïne entre

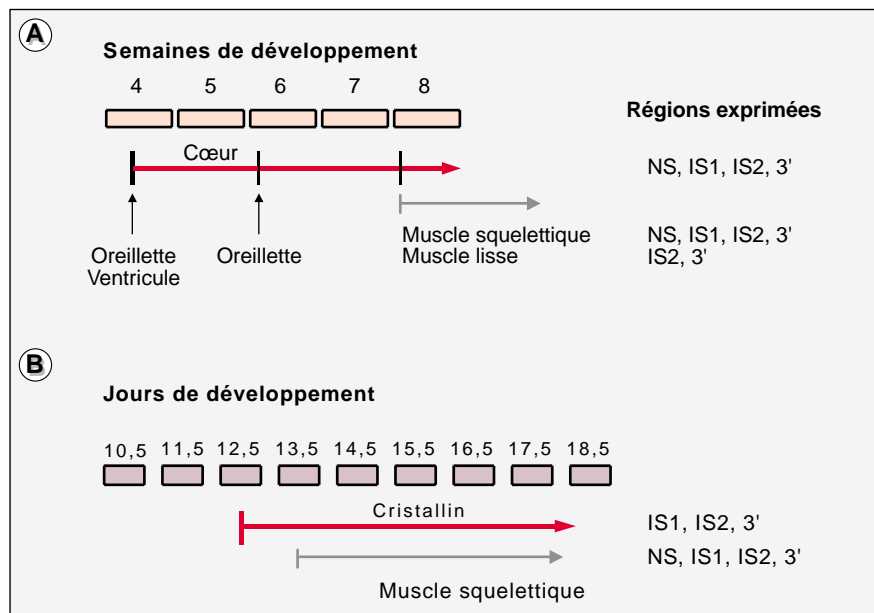


Figure 2. **Expression des transcrits de la calpaïne 3 au cours des développements embryonnaires humain (A) et murin (B) par hybridation in situ.** L'expression tissulaire révélée par les sondes (NS, IS1, IS2 et/ou 3'), spécifiées à droite de la figure, est indiquée selon la chronologie de développement de chaque espèce.

l'homme et la souris et la mise en évidence de transcrits dans d'autres tissus que le muscle squelettique doivent être pris en compte lors de l'analyse de modèles transgéniques ou *knock-out* pour le gène de la calpaïne 3 et lors d'essais thérapeutiques.

Isoformes de la calpaïne 3

En plus des données de l'hybridation *in situ*, d'autres observations, réalisées lors du clonage des ADNc des gènes humain et murin de la calpaïne 3, suggéraient l'existence de formes différentes résultant d'un épissage alternatif de ces gènes. Une recherche systématique par RT-PCR de tels variants de la calpaïne 3 a confirmé chez la souris que différents événements affectent les régions NS, IS1, IS2 et le domaine de liaison au calcium (*figure 1*) [10]. Ils peuvent être divisés en trois catégories: (a) les épissages des exons 6, 15 et/ou 16, qui respectent la phase de lecture; (b) la conservation, au niveau de l'ARN messenger, de deux séquences différentes présentes dans l'intron 16, qui entraîne un changement du cadre de lecture et, probablement, la traduction d'une protéine tronquée de son domaine liant le calcium; (c) le remplacement de l'exon 1 par un premier exon 1', dit spécifique du cristallin, vraisemblablement transcrit à partir d'un deuxième promoteur situé au niveau de l'intron 1. L'épissage des exons 4, 5 ou 7, la rétention de l'intron 18 sont plus rarement observés.

Nos travaux, ainsi que ceux d'autres équipes dont celle du Dr Shearer (Portland, OR, USA), ont montré que la combinaison de ces différents événements résultait en une grande diversité des messagers de la calpaïne 3, selon les tissus et selon le stade de développement. Globalement chez l'embryon murin, les formes majoritaires sont les formes épissées, au niveau soit de l'exon 6, soit des exons 15 et 16. Chez la souris et l'homme adultes, la calpaïne 3 classique reste la forme majoritaire dans les muscles squelettiques. Des isoformes variables, trop nombreuses pour être toutes citées, ont été détectées chez différentes espèces (souris, rat, chien, tau-

reau, porc) dans le muscle lisse, le tissu cardiaque, le cerveau, le thymus et dans différents tissus de l'œil dont bien sûr, le cristallin [10, 11] (Dickson *et al.*, Genbank n° AF127766). Les observations dans l'œil sont particulièrement intéressantes: les isoformes observées, nommées d'après le poids moléculaire de la protéine correspondante et comprenant toujours une séquence transcrite de l'exon 1', Lp82 (GenBank n° U96367), Lp85 (n° AF052540) et Rt88 (n° AF061726), ont été détectées pour la première fois au niveau protéique [12].

De même que l'expression embryonnaire de la calpaïne différait entre l'homme, la souris et d'autres espèces, il semble que les isoformes de la calpaïne 3 ne sont pas identiques dans les deux espèces: chez l'homme, seuls les exons 6, 15 et 16 sont épissés (*catégorie [a] ci-dessus*) et les isoformes correspondantes ont été observées dans des cultures primaires de myoblastes et myotubes, dans les leucocytes et au niveau embryonnaire (GenBank n° AF127765 et AF127764), mais aucune forme correspondant aux deux autres catégories (*b et c*) n'a été mise en évidence. Une analyse fine de la séquence nucléotidique permet d'apporter quelques explications quant à ces différences: (a) aucun promoteur alternatif n'a pu être prouvé en amont de la séquence humaine correspondant à l'exon 1' murin; de plus, la présence d'un codon stop en phase dans cette séquence conduirait à l'arrêt prématuré d'une éventuelle traduction; ces observations sont en accord avec les données issues de l'hybridation *in situ* indiquant qu'il n'existe pas de formes spécifiques du cristallin chez l'homme [9]; (b) l'absence de sites d'épissage cryptiques dans l'intron 16 humain interdirait la rétention des séquences introniques int137 et int308 [9]; (c) l'intron 18 présente, chez l'homme, un décalage du cadre de lecture, et sa conservation conduirait à une protéine tronquée, différente de celles observées dans des myoblastes de souris et dans le cristallin du rat.

Il est évident que la traduction de ces isoformes entraîne des modifications de la structure et des propriétés de la calpaïne 3, affectant sa localisation

subcellulaire, sa régulation par le calcium, et sa liaison à la titine, mais aussi la modulation de l'activité enzymatique et la reconnaissance de substrats. De plus, ces différentes isoformes qui affectent les régions spécifiques de la calpaïne 3 permettent d'explorer la spécificité de cette protéase par rapport aux autres calpaïnes. Les conséquences des différents événements sur les propriétés connues de la calpaïne peuvent être déduites des caractéristiques des domaines impliqués et d'études fonctionnelles que nous avons menées. C'est ainsi que l'autolyse, la lyse de la fodrine ou encore la liaison à la titine ont été examinées *in vitro* après expression des différentes isoformes. L'absence de l'exon 6, événement le plus fréquemment observé, affecte l'autolyse de la protéine mais pas sa capacité à dégrader la fodrine ou à se lier à la titine (*figure 1*) [10]. Cette observation est en accord avec la localisation dans cet exon de deux des trois sites de coupure par autolyse [13] et suggère une participation séquentielle de ces sites dans le phénomène d'autolyse. De par sa position dans le site catalytique, il est également possible que l'exon 6 joue un rôle déterminant dans la reconnaissance d'un substrat spécifique. La région IS2, qui comporte un site de liaison à la titine et un signal de translocation nucléaire, et où semble se concentrer toute une série d'épissages alternatifs (*figure 1*), pourrait également être impliquée dans plusieurs de ces fonctions. L'épissage de l'exon 15, qui inclut aussi un site de localisation nucléaire, pourrait donc moduler la localisation cellulaire de la calpaïne 3. La délétion de l'exon 16 a deux effets: elle affecte les deux types de protéolyse dont la dépendance vis-à-vis du calcium s'accroît, et elle entraîne une augmentation de la liaison à la titine (*figure 1*). Peut-être ces deux phénomènes résultent-ils d'un changement de conformation de la protéine lié à l'absence de l'exon 16. La conservation de la liaison à la titine dans le cas des épissages des exons 15 et 16 indique que les sites de liaison ne sont pas situés dans les exons concernés. Enfin, la traduction d'isoformes possédant les deux séquences de l'intron 16

conduirait à la suppression du domaine IV de liaison au calcium, un mécanisme qui a déjà été observé dans le cas des calpaïnes spécifiques de l'estomac [14].

On le voit, la famille des calpaïnes devient de plus en plus complexe : non seulement de nouveaux gènes sont identifiés régulièrement (9 calpaïnes de mammifères sont actuellement répertoriées) mais chacun de ces gènes est susceptible, à l'instar de celui de la calpaïne 3, de donner naissance à des isoformes variées ayant des profils d'expression spécifiques d'un tissu donné.

Apoptose et LGMD2A

Un certain nombre de dystrophies musculaires sont caractérisées par un profil dit de « nécrose-régénération ». Dans le cas de la dystrophie de Duchenne par exemple (*m/s* 1988, n° 3, p. 141), 30 % à 40 % des fibres expriment la myosine développementale, un marqueur de régénération musculaire [15] (*m/s* 1998, n° 10, p. 1077). Bien que la LGMD2A soit également caractérisée par un profil de nécrose-régénération, seulement 3 % à 4 % des fibres sont reconnues par un anticorps monoclonal dirigé contre la myosine développementale [16]. Nous nous sommes donc demandé si la perte musculaire observée dans la LGMD2A pouvait résulter non seulement d'un processus nécrotique, mais également d'une mort cellulaire programmée ou apoptose. L'application de la méthode TUNEL à l'analyse de sections de biopsies musculaires provenant de patients atteints de diverses pathologies musculaires a effectivement révélé des noyaux apoptotiques dans les fibres musculaires de 13 patients atteints de

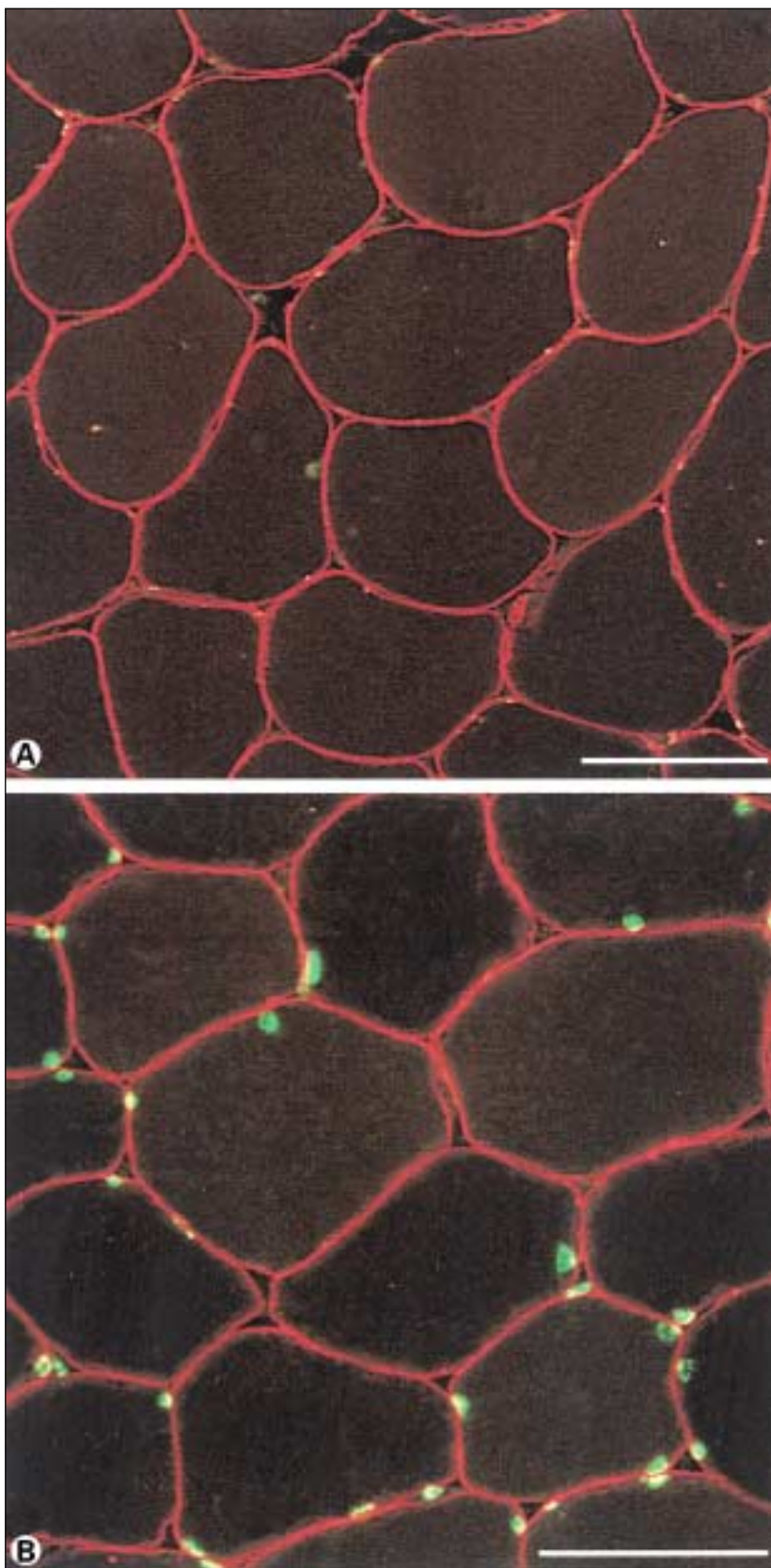


Figure 3. **Mise en évidence, par la méthode TUNEL, de noyaux en apoptose dans le tissu musculaire d'un patient LGMD2A.** Un double marquage TUNEL/Dystrophine ne montre aucun noyau en apoptose dans le tissu musculaire d'un individu sain (A). La même technique permet de confirmer la présence de noyaux apoptotiques dans les fibres musculaires d'un patient LGMD2A (B). Barres d'échelle : 60 μ m.

LGMD2A (figure 3A) alors qu'aucune image de ce type n'a pu être mise en évidence dans des biopsies musculaires d'individus sains (figure 3B) ou affectés par d'autres myopathies (c'est-à-dire dystrophie musculaire de Miyoshi, dystrophie facio-scapulo-humérale, dystrophie musculaire de Duchenne, myopathie de Becker, α - et γ -sarcoglycanopathies).

Pour que le défaut en calpaïne explique ce phénomène d'apoptose, une possibilité était que cette enzyme ait une activité régulatrice sur des facteurs de transcription connus pour activer des gènes de survie. Parmi tous ces facteurs, notre attention s'est portée sur NF κ B, un hétérodimère composé des sous-unités p65 (Rel A) et p50 (pour revue voir [17, 18]). NF κ B est séquestrée dans le cytoplasme *via* une interaction avec son inhibiteur I κ B α qui masque la séquence de translocation nucléaire présente sur Rel A. La protéolyse d'I κ B α permet la translocation nucléaire de NF κ B où il va activer la transcription de ses gènes cibles. Un certain nombre d'arguments militent en faveur de NF κ B: (1) les calpaïnes ubiquitaires contrôlent son activité par la protéolyse de son inhibiteur I κ B α [19]; (2) l'entrée de NF κ B dans le noyau induit l'expression de nombreux gènes dont certains codent pour des protéines de survie [20]; (3) l'inhibition de la translocation de NF κ B dans le noyau par une forme non phosphorylable et non dégradable d'I κ B α induit l'apoptose dans des fibroblastes transformés par *ras* [21]; (4) les fibres musculaires des patients atteints de LGMD2A présentent un taux d'apoptose 60 fois supérieur à celui d'autres pathologies musculaires [16].

Des expériences d'immunofluorescence indirecte nous ont permis de montrer que ce phénomène apoptotique est étroitement associé à une accumulation sarcoplasmique et

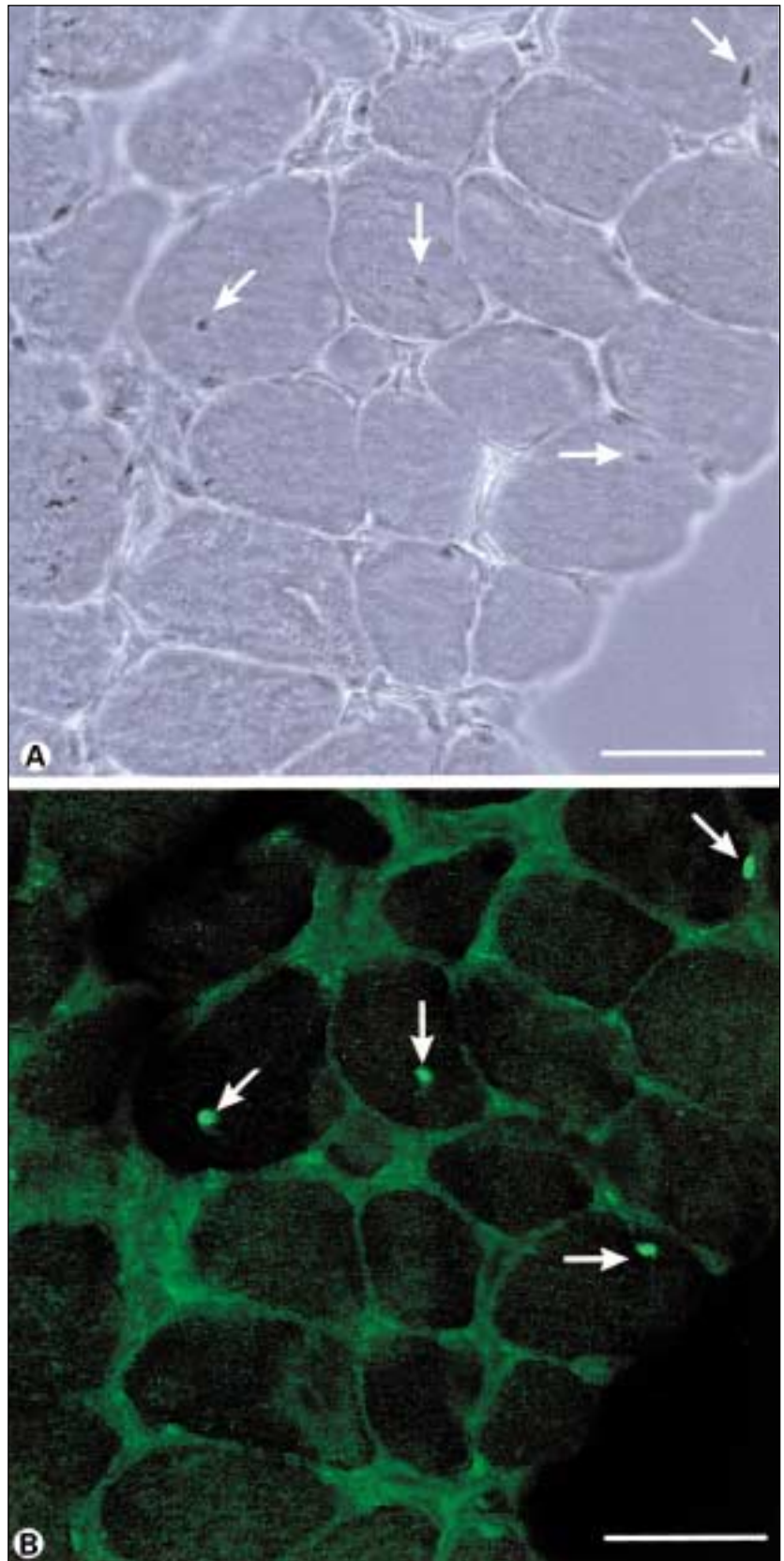


Figure 4. **Localisation nucléaire de la calpaïne 3 dans le tissu musculaire d'un patient DMD.** Les noyaux visibles en contraste de phase (A) et marqués en immunofluorescence indirecte (B) sont indiqués par des flèches. Barres d'échelle: 60 μ m.

nucléaire d'IκBα ainsi qu'à un blocage de l'entrée de NFκB dans le noyau. Nous avons également démontré en co-exprimant la calpaïne 3 et IκBα dans un système hétérologue qu'IκBα était un substrat potentiel de cette enzyme *in vitro* [16]. L'ensemble de ces résultats suggère que la LGMD2A pourrait être causée par la perte du rôle protecteur d'apoptose de NFκB piégé dans le cytoplasme par IκBα, ce dernier n'étant plus dégradé en raison de l'absence de la calpaïne 3.

Il est maintenant essentiel de déterminer si cette régulation s'exerce de façon directe ou indirecte *via* d'autres facteurs capables d'influer sur la stabilité d'IκBα et/ou sa localisation nucléaire. Il est particulièrement séduisant de penser que l'activité régulatrice de la calpaïne 3 sur IκBα puisse s'exercer dans le noyau. Cette hypothèse est corroborée par la présence d'un motif de translocation nucléaire dans la région IS2 de la calpaïne 3 [5] et la démonstration de la présence de celle-ci dans le noyau [16] (figure 4). Notre prochain objectif sera donc de tester cette hypothèse qui, si elle est vérifiée, permettra d'expliquer les premières étapes de la séquence des événements conduisant à un processus dystrophique chez les patients atteints de LGMD2A.

Conclusions

L'identification d'une relation de cause à effet entre déficience en calpaïne 3 et apoptose permettrait de reconnaître la LGMD2A au sein des LGMD et laisse entrevoir l'élucidation de son rôle et la définition de cibles (dont les gènes de survie spécifiques du muscle contrôlés par NFκB) d'une stratégie thérapeutique. Les retombées médicales et les perspectives thérapeutiques paraissent donc très prometteuses. Sur le plan fondamental, ces travaux illustrent l'intérêt de l'étude des pathologies musculaires pour disséquer les voies de régulation de l'apoptose dans les myocytes, modèle remarquable en raison du grand nombre de noyaux et de mitochondries et de leur durée de vie particulièrement longue ■

Remerciements

Nous tenons à remercier toute l'équipe du Dr Sorimachi (Tokyo) avec laquelle nous collaborons depuis plusieurs années. Nous remercions tous les membres de nos laboratoires ainsi que le Dr L.V.B. Anderson, C. Astier, R. Chemaly, G. Halaby, J. Loiselet et P. Mangeat. Les travaux mentionnés ont été rendus possible grâce au soutien de l'Association Française contre les Myopathies, des Universités Saint-Joseph de Beyrouth et Montpellier II, des Cnrs français et libanais, de l'Inserm et de l'Ambassade de France au Liban. M.H. est boursière de l'AFM.

Muriel Herasse

Françoise Fougrousse

Daniel Stockholm

Jacques S. Beckmann

Isabelle Richard

Généthon, Cnrs URA 1923, 1, rue de l'Internationale, 91000 Évry, France.

Stephen Baghdiguiian

Marianne Martin

Laboratoire de dynamique moléculaire des interactions membranaires, Cnrs-UMR 5539, Université Montpellier II, place Eugène-Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France.

Gérard Lefranc

Institut de Génétique Humaine, Cnrs UPR1142, 141, rue de la Cardonille, 34396 Montpellier Cedex 5, et Université Montpellier II, France.

RÉFÉRENCES

- Fardeau M, Hillaire D, Mignard C, *et al.* Juvenile limb-girdle muscular dystrophy: clinical, histopathological, and genetic data from a small community living in the Reunion Island. *Brain* 1996; 119: 295-308.
- Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. Structure and physiological function of calpains. *Biochem J* 1997; 328: 721-32.
- Sorimachi H, Imajoh-Ohmi S, Emori Y, *et al.* Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-type. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J Biol Chem* 1989; 264: 20106-11.
- Sorimachi H, Kimbara K, Kimura S, *et al.* Muscle-specific calpain, p94, responsible for

limb-girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence. *J Biol Chem* 1995; 270: 31158-62.

5. Sorimachi H, Toyama-Sorimachi N, Saido TC, *et al.* Muscle-specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting in disappearance from muscle. *J Biol Chem* 1993; 268: 10593-605.

6. Ono Y, Shimada H, Sorimachi H, *et al.* Functional defects of a muscle-specific calpain, p94, caused by mutations associated with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *J Biol Chem* 1998; 273: 17073-8.

7. Fougrousse F, Durand M, Suel L, *et al.* Expression of genes (CAPN3, SGCA, SGCB and TTN) involved in progressive muscular dystrophies during early human development. *Genomics* 1998; 48: 145-56.

8. Fougrousse F, Anderson LVB, Delezoise AL, Suel L, Durand M, Beckmann JS. Calpain 3 expression during human cardiogenesis. *Neuromuscul Disord* 2000 (sous presse).

9. Fougrousse F, Bullen P, Herasse M, *et al.* Human-mouse differences in the expression patterns of disease genes and developmental control genes during early development. *Hum Mol Genet* 2000 (sous presse).

10. Herasse M, Ono Y, Fougrousse F, *et al.* Expression and functional characteristics of Calpain 3 isoforms generated through tissue-specific transcriptional and post-transcriptional events. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 4047-55.

11. Ma H, Fukiage C, Azuma M, Shearer TR. Cloning and expression of mRNA for calpain Lp82 from rat lens: splice variant of p94. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 454-61.

12. Ma H, Shih M, Hata I, Fukiage C, Azuma M, Shearer TR. Protein for Lp82 Calpain is expressed and enzymatically active in young rat lens. *Exp Eye Res* 1998; 67: 221-9.

13. Kinbara K, Ishiura S, Tomioka S, *et al.* Purification of native p94, a muscle-specific calpain, and characterization of its autolysis. *Biochem J* 1998; 335: 589-96.

14. Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. A novel tissue-specific calpain species expressed predominantly in the stomach comprises two alternative splicing products with and without Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem* 1993; 268: 19476-82.

15. Marini JF, Pons F, Leger J, *et al.* Expression of myosin heavy chain isoforms in Duchenne muscular dystrophy patients and carriers. *Neuromusc Disord* 1991; 1: 397-409.

16. Baghdiguiian S, Martin M, Richard I, *et al.* Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the IκBα/NFκB pathway in limb girdle muscular dystrophy type 2A. *Nat Med* 1999; 5: 503-11.

RÉFÉRENCES

17. Baldwin ASJ. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Ann Rev Immunol* 1996; 14: 649-81.
18. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Ann Rev Immunol* 1998; 16: 225-60.
19. Han Y, Weinman S, Boldogh I, Walker RK, Brasier AR. Tumor necrosis factor-inducible I κ Ba proteolysis mediated by cytosolic m-calpain. A mechanism parallel to the ubiquitin-proteasome pathway for NF- κ B activation. *J Biol Chem* 1999; 274: 787-94.
20. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B. *Science* 1996; 274: 787-90.
21. Mayo MW, Wang CY, Cogswell PC, et al. Requirement of NF- κ B activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic ras. *Science* 1997; 278: 1812-5.

TIRÉS À PART

I. Richard.

■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **Une antibiothérapie pour surpasser les mutations nonsens du gène de la dystrophine ?** Il était déjà connu que l'addition d'aminoglycosides dans le milieu de culture de cellules issues de patients atteints de mucoviscidose et porteurs d'un codon stop prématuré du gène CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) était capable de restaurer l'expression de ce gène [1, 2]. Une équipe américaine vient d'appliquer cette démarche à la myopathie de Duchenne, mais cette fois, apporte une preuve de la faisabilité de cette approche directement *in vivo* [3]. En effet, dans le modèle murin *mdx* de cette affection une mutation ponctuelle dans le gène entraîne un arrêt prématuré de la synthèse de dystrophine. Les auteurs ont tout d'abord démontré que des cellules musculaires issues de muscles de nouveaux *mdx*, cultivées en présence de 300 μ g/ml de gentamycine néosynthétisaient la dystrophine. Néanmoins, la fenêtre efficace semble étroite puisque en deçà de cette

dose, aucun effet n'est noté alors qu'au-delà, l'effet est délétère. La suppression de ces codons stop passant vraisemblablement par l'insertion d'un nouvel acide aminé en lieu et place du codon nonsens, on peut supposer qu'une telle lecture du message protéique par la machinerie de traduction puisse être délétère, appliquée à l'ensemble des protéines... Il était néanmoins tentant d'étudier le pouvoir « réparateur » de cette antibiothérapie directement *in vivo*. Lorsque la gentamycine est administrée en injection quotidienne sous-cutanée pendant 14 jours, il est possible de détecter, chez certains des animaux, un niveau de dystrophine de l'ordre de 10 % à 20 % de la normale. Ce niveau d'expression suffit à protéger le muscle ainsi traité contre des dommages induits par des contractions provoquées. De plus, le niveau des créatine kinases sériques de ces animaux chute significativement, indiquant bien une diminution du processus nécrotique, caractéristique de l'affection. Ces résultats

sont indiscutablement intéressants puisque, en dehors de la greffe de moelle osseuse, déjà rapportée dans ces colonnes (*m/s* 1999, n° 12, p. 1427), il s'agit du premier essai thérapeutique de cette dystrophie musculaire utilisant une voie d'administration générale et donc susceptible de corriger l'ensemble de la musculature squelettique des patients. Néanmoins, en dehors de l'ototoxicité et de la néphrotoxicité de cette antibiothérapie, deux points méritent d'être soulignés: (1) les mutations engendrant un codon stop ne représentent qu'un faible pourcentage des mutations du gène de la dystrophine chez l'homme; (2) la posologie et le mode d'administration risquent de constituer le talon d'Achille de cette approche thérapeutique.

[1. Howard M, et al. *Nat Med* 1996; 2: 467-9.]

[2. Bedwell, et al. *Nat Med* 1997; 3: 1280-4.]

[3. Barton-Davis E, et al. *J Clin Invest* 1999; 104: 375-81.]