

La ou les dystrophine(s), trois années après leur découverte

Jean J. Léger
Nathalie Augier
Jocelyne Léger
Dominique Mornet
Françoise Pons

Le gène de la dystrophine, situé sur le bras court du chromosome X (en Xp21), code pour au moins trois familles de protéines, familles elles-mêmes microhétérogènes du fait de multiples phénomènes d'épissages alternatifs du transcrit primaire comptant plus de 70 exons et mesurant (d'un seul tenant ?) près de 2,5 millions de bases. Deux de ces familles d'ARN viennent de l'utilisation de deux promoteurs alternatifs, l'un actif dans les neurones et l'autre dans les cellules musculaires. Les messagers correspondant de 14 kb, ont un premier exon différent et codent pour des protéines de 400 kDa divisés en domaines : de l'extrémité NH₂ à l'extrémité COOH terminale, on trouve une région pouvant fixer l'actine, puis des motifs répétés de type spectrine, une zone riche en cystéine évoquant des motifs peptidiques fixant le calcium, et enfin un domaine pénétrant dans la membrane plasmique et interagissant avec des glycoprotéines. Un ARN de 6,5 kb, codant très probablement pour une protéine de 80 kDa comprenant les deux derniers domaines de la dystrophine, contient les exons 3' du messenger dystrophine et pourrait correspondre à l'utilisation d'un troisième promoteur interne au gène, d'activation ubiquitaire. Par ailleurs, d'autres protéines immunologiquement reliées à la dystrophine mais non codées par le gène de la myopathie de Duchenne existent. Le gène *DRP* (*dystrophin related protein*) de l'une d'entre elle est situé sur le bras long du chromosome 6 (en 6q21). Le développement de multiples anticorps monoclonaux permet une meilleure caractérisation des protéines « dystrophines » en physiologie et pathologie. Beaucoup d'efforts restent néanmoins nécessaires pour assigner des fonctions définies à chacune de ces espèces.

ADRESSES

J.J. Léger : *Cnrs, directeur de l'U.300 de l'Inserm*. N. Augier : *chercheur boursier de l'AFM*. J. Léger : *chargée de recherche à l'Inserm*. D. Mornet : *directeur de recherches au Cnrs*. F. Pons : *maître de conférences à la faculté de médecine*.

Unité de recherches en physiopathologie cellulaire et moléculaire de l'Inserm (U.300), faculté de pharmacie, avenue Charles-Flahault, 34060 Montpellier Cedex, France.

RÉFÉRENCES

1. Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin : the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus, *Cell*, 1987; 51 : 919-28.
2. Kœnig M, Hoffman EP, Berthelson CJ, et al. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987 ; 50 : 509-17.
3. Worton RG. Genetics of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Rev Genet* 1988 ; 22 : 601-29.
4. Hoffman EP. Human molecular genetics and the elucidation of the primary biochemical defect in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Motil Cytoskel* 1989 ; 14 : 163-8.
5. Kaplan JC, Delpech M. Un succès de la génétique inverse : la myopathie de Duchenne. In *Biologie moléculaire et médecine* Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 1989 : 308-19.
6. Kœnig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988 ; 53 : 219-28.
7. Lemaire C, Heilig R, Mandel JL. The chicken dystrophin cDNA : striking conservation of the C-terminal coding and 3, untranslated regions between man and chicken. *EMBO J* 1988 ; 7 : 4157-62.
8. Jung D, Pons F, Leger JJ, et al. Dystrophin in central nervous system : a developmental, regional distribution and subcellular localization study. *Neurosci Lett* 1991 ; 124 : 87-91.
9. Lidov HGW, Byers TJ, Watkins SC, et al. Localization of dystrophin to postsynaptic regions of central nervous system cortical neurons. *Nature* 1990 ; 348 : 725-8.
10. Chelly J, Gilgenkrantz H, Lambert M, et al. Effect of dystrophin gene deletions on mRNA levels and processing in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Cell* 1990 ; 63 : 1239-48.
11. Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Karpati G, et al. The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature* 1988 ; 333 : 466-9.
12. Kao L, Krstenansky J, Mendell J, et al. Immunological identification of a high molecular weight protein as a candidate for the product of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1988 ; 85 : 4491-5.
13. Tanaka H, Shimizu T, Ozawa E. Expression of a dystrophin-like protein on the surface membrane of muscle cells in mdx mice. *Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences* 1989 ; 65 : 238-41.

La « dystrophine », protéine codée par le gène impliqué dans la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), a été identifiée à la fin de l'année 1987 [1, 2]. Cette découverte était l'aboutissement d'une longue histoire commencée vers 1860 par les observations cliniques de Duchenne, individualisant cette forme la plus grave et la plus fréquente des dystrophies musculaires progressives. La mise en évidence de la dystrophine constitue le premier succès de la génétique inverse, démarche qui consiste à localiser, isoler et identifier le gène morbide sans connaître la protéine. Les deux étapes décisives dans cette approche ont été la localisation régionale sur le chromosome X du locus morbide par *linkage* à un polymorphisme de restriction humain et l'isolement de fragments d'ADN complémentaire codants dans le gène DMD [3, 4] (pour un ensemble de références et pour une description détaillée de la découverte du gène, voir [3-5]).

Les principales caractéristiques du locus morbide de la myopathie de Duchenne, déduits des études de génétique inverse, ont été résumées dans le *Tableau I*. Le séquençage des ARN messagers des dystrophines des muscles squelettiques d'homme et de poulet [6, 7] a permis de déduire la structure primaire des protéines correspondant. Un « portrait robot » [5], décrivant la dystrophine comme un arrangement de quatre modules structuraux différents, a alors été

tracé (*figure 1*) [6]. Certains de ces modules présentant des analogies structurales avec d'autres protéines connues du cytosquelette comme l'actinine ou la spectrine, des hypothèses sur leurs propriétés fonctionnelles ont été formulées. La découverte de la dystrophine, protéine déficiente chez les malades atteints de myopathie de Duchenne, est apparue immédiatement comme un espoir pour les malades atteints de myopathie et leur famille. L'identification de la protéine impliquée dans la maladie devrait permettre à terme une meilleure connaissance de ses fonctions et de son rôle dans le mécanisme de la myopathie de Duchenne. Cela devrait conduire à de nouveaux outils diagnostiques et, peut-être, ouvrir la voie à des thérapeutiques efficaces.

Cette revue présentera successivement :

- des généralités sur la dystrophine, sur les méthodes et outils employés.
- les progrès théoriques et les résultats expérimentaux concernant les relations structure/fonctions et la localisation de la dystrophine.
- les informations sur les isoformes liées au chromosome X et autosomiques des dystrophines et leur probable spécificité tissulaire et/ou fonctionnelle.

La conclusion traitera des conséquences des connaissances actuelles sur la pratique diagnostique et des orientations possibles des recherches futures. Les aspects très importants concernant la régulation des gènes codant

Tableau I

PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DU LOCUS MORBIDE DE LA MYOPATHIE DE DUCHENNE

• gène	: localisation	: Xp21
	: taille	: 2000kb
	: nbre exons	: > 75
• ARNm	: spécificité tissulaire	: muscles et cerveau
	: taille	: 14 kb
	: abondance	: 0,01 %
	: séquence codante	: 11 kb
• protéine	: taille calculée	: 427 000
	: identification	: dystrophine

pour les dystrophines ou les modèles animaux déficients en dystrophine ne seront pas abordés ici.

Généralités sur la dystrophine. Méthodes et outils

La dystrophine est faiblement abondante dans les tissus où elle est exprimée (environ 0,1 mg dans 10 g de muscle squelettique) [1]. L'emploi d'anticorps est donc toujours nécessaire pour la détecter. Les antigènes utilisés pour fabriquer les anticorps nécessaires ont été, et sont encore, soit des protéines recombinantes issues d'ADN complémentaires codant pour un fragment limité de telle ou telle dystrophine, soit des peptides synthétiques dérivés à partir des séquences connues. Les sérums polyclonaux ainsi obtenus ont permis initialement d'identifier et de localiser la dystrophine du muscle squelettique normal. Les figures 2 et 3 donnent des exemples des deux approches expérimentales les plus utilisées : l'immunocytochimie en microscopie optique et l'immunoempreinte sur feuille de nitrocellulose (*Western blot*). Les images en immunofluorescence de muscles squelettiques humains normaux et pathologiques, obtenues avec des anticorps préparés contre des fragments de dystrophine des muscles squelettiques (figure 2), montrent ainsi que la dystrophine :

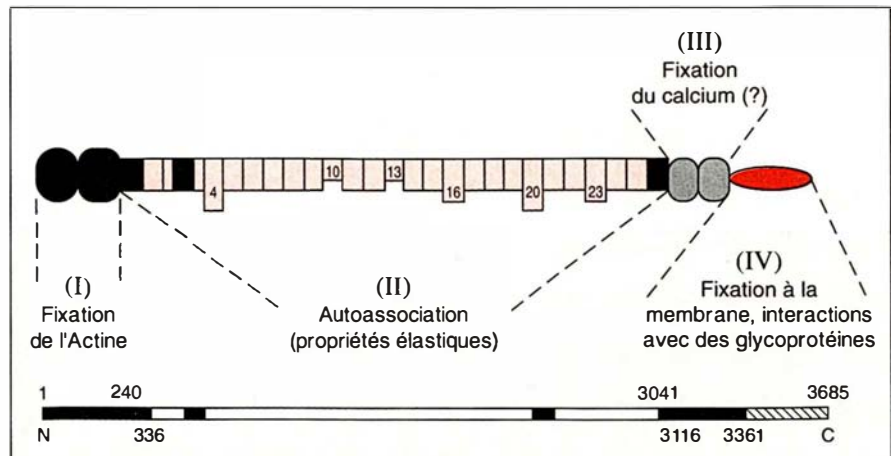


Figure 1 : **Portrait robot de la dystrophine : arrangement en quatre modules fonctionnels.** La numérotation des résidus correspond à la séquence déduite de l'ADN complémentaire codant pour la dystrophine de muscle humain foetal [6].

- est localisée à la périphérie des cellules des muscles normaux ;
- est absente des muscles de patients atteints de myopathie de Duchenne ;
- a parfois une expression réduite à la périphérie des cellules musculaires de patients atteints de myopathie de Becker ;
- a souvent une expression mosaïque chez des femmes porteuses de la myopathie de Duchenne.

Les mêmes sérums polyclonaux permettent de constater la présence de dystrophine à la périphérie de tous

les muscles lisses ou striés normaux, ou des zones particulières du cerveau [8, 9]. Les études par immun empreinte indiquent que la dystrophine ainsi détectée en immunocytochimie a une masse moléculaire d'environ 400 000 dans la plupart des muscles et organes normaux étudiés (figure 3, p. 808). Cette bande immunoréactive est absente dans les muscles de patients DMD si l'immunoanalyse est faite avec des anticorps poly- ou monoclonaux spécifiques de la dystrophine du muscle squelettique normal, codée au locus Xp21 [1].

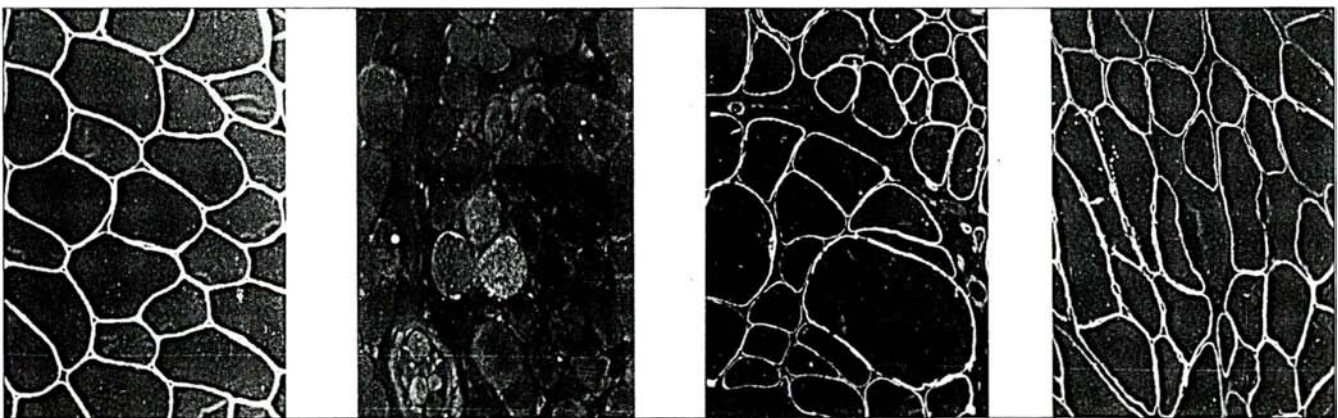


Figure 2 : **Détection immunocytochimique de la dystrophine, impliquée dans la myopathie de Duchenne** (anticorps polyclonaux contre la région semblable à la spectrine (résidus 1173-1728) de muscle squelettique de poulet [7]). Muscles squelettiques humains, normaux et pathologiques : Normal, DMD, BMD, et femme porteuse.

Les mêmes sérums spécifiques révèlent que la dystrophine du muscle squelettique chez des patients BMD peut avoir une masse moléculaire inférieure ou supérieure à la valeur normale. Cette réduction de taille est caractéristique d'une délétion « en phase » du gène codant pour la dystrophine. La délétion chez les patients BMD permet, de cette manière, l'expression d'une dystrophine tronquée, à laquelle manquent naturellement les régions codantes comprises dans la zone délétée, mais qui a des séquences normales en amont et en aval de cette zone [3, 10]. Il faut souligner là que la technique d'immuno-empreinte est indispensable pour connaître la taille de la (ou des) molécule(s) à l'origine de l'immunoréactivité observée en immunocytochimie, en particulier pour visualiser les éventuelles réactivités croisées avec d'autres composants.

La figure 4 résume les efforts entrepris depuis 1987 pour produire des sérums polyclonaux puis monoclonaux contre des régions diverses de la dystrophine des muscles squelettiques humains et de poulet. La plus grande partie des travaux (plus des deux tiers des articles publiés, traitant de la dystrophine au niveau protéique) ont été faits avec des sérums obtenus à partir des deux fragments recombinants produits initialement (protéines de fusion : 30 and 60 kDa [1]. Une centaine de peptides de la dystrophine ont également été synthétisés dans différents laboratoires. Seulement deux à trois peptides ont donné des réponses immunes, permettant de reconnaître la dystrophine native, c'est-à-dire à la périphérie des fibres musculaires ou par immuno-empreinte [11-13]. Sans minimiser l'apport significatif des sérums polyclonaux dans l'étude de la dystrophine, il faut rappeler que les spécificités et titres des sérums varient d'un animal à un autre, d'un prélèvement à un autre. Tous les sérums polyclonaux préparés à partir de larges segments des dystrophines (quelques centaines, voire un ou deux mille résidus) contiennent des populations hétérogènes d'anticorps. Certains anticorps dans ces sérums sont naturellement spécifiques de la structure injectée (le plus souvent un fragment de la dystrophine du muscle

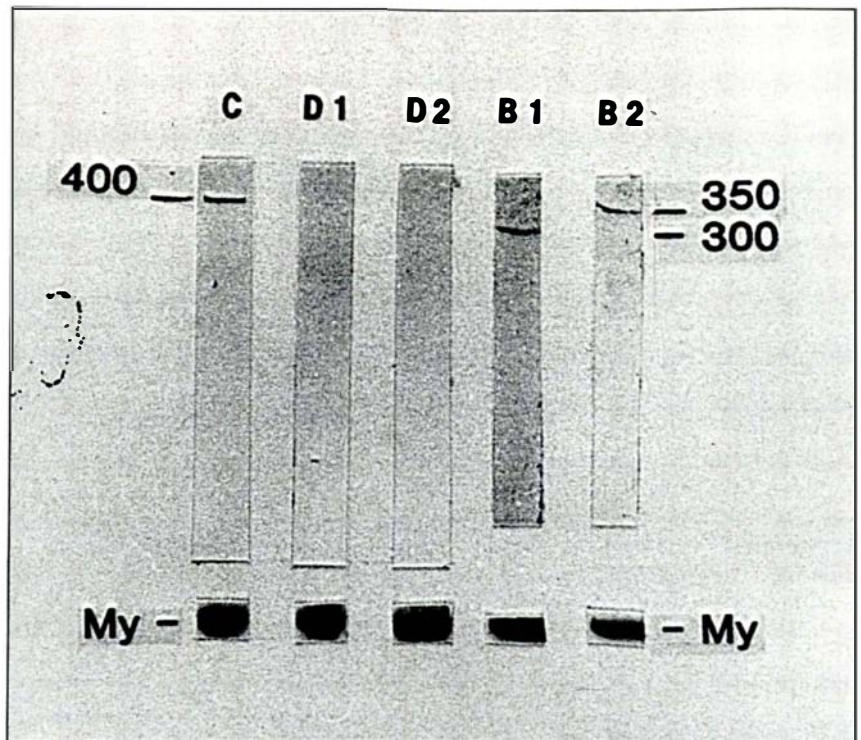


Figure 3. **Immunoempreintes de la dystrophine, impliquée dans la myopathie de Duchenne** (anticorps monoclonal spécifique de la dystrophine du locus morbide de la maladie (Xp21)). C : Normal ; D1 et D2 : DMD ; B1 et B2 : BMD ; Myo : myosine.

squelettique), d'autres réagissent avec d'autres protéines homologues de la dystrophine ou contenant des modules structuraux analogues (actinine, spectrine principalement) [23]. Ces réactivités croisées, qui sont cependant utiles pour détecter les analogies de structure, sont incontrôlables. L'emploi simultané d'anticorps préparés contre des régions différentes de la dystrophine et donc à réactivités croisées variables ont, dans quelques cas, permis de minimiser ces inconvénients inhérents aux sérums polyclonaux. La production d'anticorps monoclonaux, à spécificité définie et à haute affinité, dirigés contre des épitopes différentes le long de la molécule, représente dans tous les cas le progrès ultime et nécessaire pour analyser correctement la dystrophine, ses éventuelles isoformes ou molécules homologues. Des difficultés dans la maîtrise des fragments recombinants de dystrophine comme antigènes, la faible immunospécificité des peptides synthétiques et la difficulté encore persistante à préparer des

solutions enrichies en dystrophine native expliquent le relatif retard constaté dans la production d'anticorps monoclonaux anti-dystrophines, ce à l'exception du premier anticorps monoclonal A1C apparu dès 1988 [18].

Structure, fonctions et localisation des dystrophines « communes » (ou Xp21)

Qu'en est-il, trois ans après, des hypothèses sur la structure et les fonctions de la dystrophine, initialement déduites des séquences d'acides aminés des dystrophines des muscles squelettiques d'homme [6] et de poulet [7] ? La dystrophine est-elle composée de quatre domaines structuraux différents ? Quelle est la structure tertiaire et les fonctions de ces quatre modules ? Les résultats actuellement disponibles sur ce sujet ont été obtenus uniquement à partir de dystrophines codées par le gène situé

au locus Xp21 du chromosome X (que nous désignerons maintenant par dystrophine Xp21).

• Le domaine N-terminal (résidus 1 à 240 environ), analogue au même domaine de l'α-actinine, fixe très probablement l'actine.

Les analogies de séquences entre protéines fixant réellement ou potentiellement l'actine, en particulier la dystrophine, ont été analysées à nouveau [24]. Elles postulent que le module N-terminal de la dystrophine serait composé de deux sous-domaines A et B, issus d'une duplication assez peu fidèle d'un domaine ancestral composé d'environ 125 résidus. Par analogie, il a ainsi été suggéré que deux segments, situés à environ 100 résidus dans le sous-domaine le plus N-terminal, seraient susceptibles, l'un et l'autre, de fixer l'actine (figure 5). Des données expérimentales en faveur de la fixation de l'actine ont été obtenues par résonance magnétique nucléaire du proton à l'aide de peptides synthétiques centrés autour des résidus 1 à 33 de la dystrophine [25]. Des études, uti-

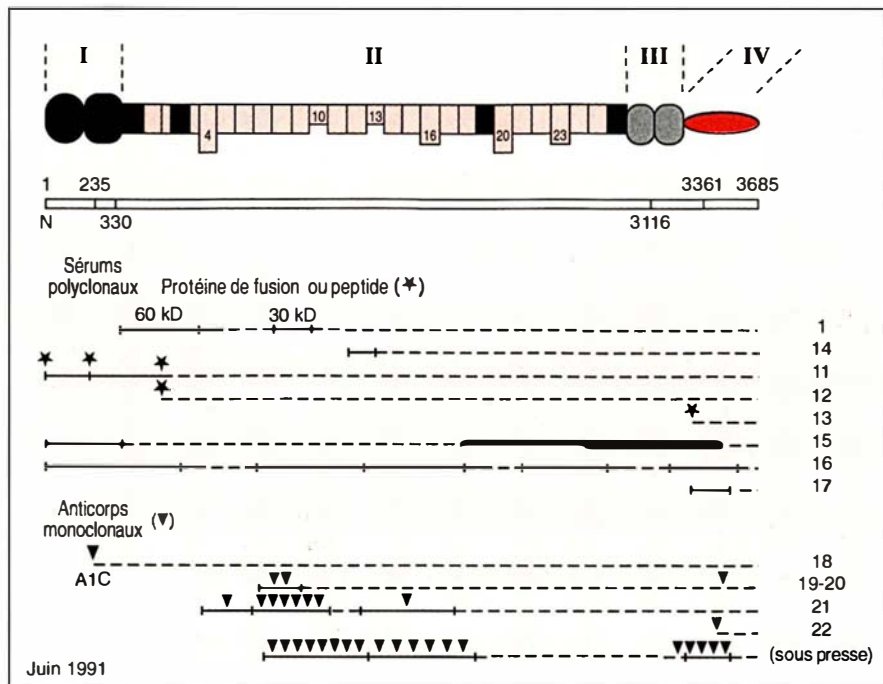


Figure 4. **Tableau représentant les générations successives d'anticorps poly- et monoclonaux contre la dystrophine.** Tous les anticorps ont été obtenus contre des peptides ou fragments recombinants, correspondants à des dystrophines du locus Xp21, sauf [17] qui a été obtenu à partir d'un ADNc partie du transcript autosomal (chromosome 6) [38].

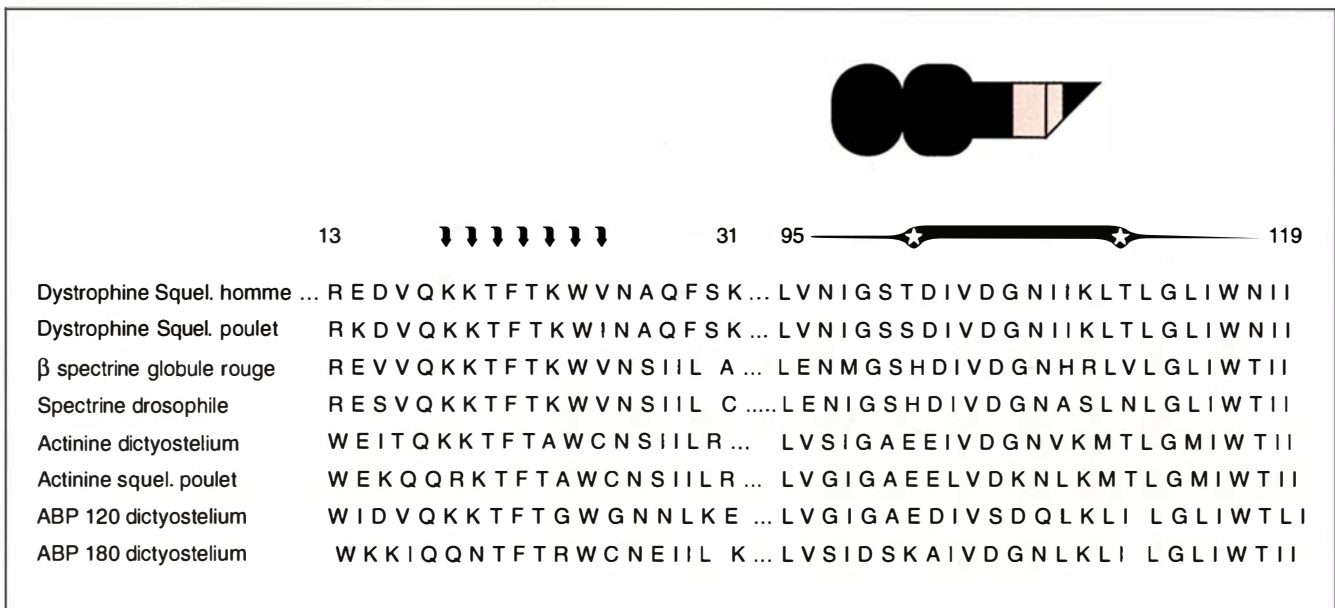


Figure 5. **Domaines de la dystrophine (Xp21) fixant l'actine [25] et comparaison des séquences avec d'autres protéines fixant l'actine.**

RÉFÉRENCES

14. Sugita H, Arahata K, Ishiguro T, *et al.* Negative immunostaining of Duchenne muscular dystrophy (DMD) and mdx muscle surface membrane with antibody against synthetic peptide fragment predicted from DMD cDNA. *Proc Japan Acad* 1988 ; 64 : 37-9.
 15. Koenig M, Kunkel LM. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals 4 potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 4560-6.
 16. Pons F, Augier N, Heilig R, *et al.* Isolated dystrophin molecules as seen by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1990 ; 87 : 7851-5.
 17. Khurana T, Hoffman EP, Kunkel LM. Identification of a chromosome 6-encoded dystrophin-related protein. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 16717-20.
 18. Shimizu T, Matsumura K, Hishimoto K, *et al.* A monoclonal antibody against a synthetic polypeptide fragment of dystrophin (amino acid sequence from position 215 to 264). *Proc Japan Acad* 1988 ; 64 : 205-8.
 19. Nicholson LVB, Davison K, Falkous G, *et al.* Dystrophin in skeletal muscle .1. Western-Blot analysis using a monoclonal antibody. *J Neurol Sci* 1989 ; 94 : 125-36.
 20. Nicholson L, Davison K, Johnson M, *et al.* Dystrophin in skeletal muscle. II. Immunoreactivity in patients with Xp21 muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 1989 ; 94 : 137-46.
 21. Man NT, Cartwright AJ, Morris GE, *et al.* Monoclonal antibodies against defined regions of the muscular dystrophy protein, dystrophin. *FEBS Lett* 1990 ; 262 : 237-40.
 22. Pons F, Augier N, Léger JOC, *et al.* A homologue of dystrophin is expressed at the neuromuscular junctions of normal individuals and DMD patients, and of normal and mdx mice : immunological evidence. *FEBS Lett.* 1991 ; 282 : 161-5.
 23. Hoffman EP, Watkins SC, Slayter HS, *et al.* Detection of a specific isoform of alpha-actinin with antisera directed against dystrophin. *J Cell Biol* 1989 ; 108 : 503-10.
 24. Matsudaira P. Modular organisation of actin crosslinking proteins. *Trends Neurol Sci* 1991 ; 16 : 87-92.
 25. Levine BA, Moir AJC, Patchel VB, *et al.* The interaction of actin with dystrophin. *FEBS Lett* 1990 ; 263 : 159-62.
- lisant la même technique avec des fragments recombinants de dystrophines, sont actuellement en cours (B. Levine, communication personnelle). Elles devraient permettre de montrer que la dystrophine se lie à l'actine, sans doute en plusieurs sites d'affinités variables. Les mêmes approches permettront également de définir les segments de l'actine impliqués dans les interactions. L'utilisation d'un agent chimique tel l'EDC (1-éthyl-3-(3'-diméthyl-aminopropyl)carbodiimide), qui associe de façon covalente l'actine et l'actinine, ne permet pas l'association entre l'actine et la dystrophine. L'analogie structurale et fonctionnelle entre les molécules d'actinine et de dystrophine est en fait limitée. Concernant les conséquences macroscopiques de ces interactions probables actine-dystrophine, il est probable que, à cause de ses grandes dimensions, la dystrophine contribue à la création (ou à la stabilité) d'un réseau plutôt qu'à la formation d'un faisceau de filaments d'actine [24] (voir schéma sur la dystrophine, *figure 9*).
- **Les domaines centraux en bâtonnet, composés de 25 éléments structuraux répétés de longueur variable (100 résidus environ), similaires aux éléments en triple hélice répétés dans l' α -actinine et la β -spectrine, s'associent entre eux pour former des filaments.**
- Deux modèles théoriques ont été proposés pour ce long domaine central de la dystrophine (résidus 336-3040) [6, 26]. Koenig et Kunkel [15], dans leur modèle le plus récent, suggèrent que le domaine central de la dystrophine est composé de 24 éléments répétés de longueur constante (109 résidus) et de quatre zones charnières non répétées, mais à haute teneur en résidus prolines. L'une des charnières serait placée au début (résidus 262-335) et l'autre à la fin (résidus 3041-3118) du domaine central de la dystrophine. Les deux autres charnières seraient entre les éléments répétés 3 et 4 (résidus 668-717) et 19 et 20 (résidus 2434-2470). L'élément répété serait composé de quatre petites hélices liées par trois segments, d'une manière analogue à ce qui a été observé pour la spectrine. Dans l'autre modèle, Cross *et al.* [26] sug-
- gèrent que le domaine central de la dystrophine est composé de 25 (et non 24) éléments répétés de longueur plus ou moins variable, et seulement de deux charnières placées aux deux extrémités du domaine central. Sept résidus hydrophobes successifs seraient disposés régulièrement dans chaque élément répété. Ceux-ci seraient composés des quatre arrangements structuraux suivants : hélice 1, segment de liaison 1, hélice 2 et segment de liaison 2. Le motif structural créé par le repliement de trois hélices successives serait alors plus épais que celui observé dans la spectrine. Toutes ces ministructures, à l'exception des hélices 2, sont de longueur constante. Les hélices de type 2 sont notamment plus courtes dans les éléments répétés 10 et 13, et beaucoup plus longues dans les éléments répétés 4 et 20 (*figure 6*). Ces variations locales doivent théoriquement produire des distorsions locales dans la structure tertiaire du domaine central de la dystrophine. Nous avons récemment observé que la zone correspondante à la fin de l'élément répété 13 (autour du résidu 1740) était effectivement la plus sensible à la protéolyse ménagée, donnant ainsi un support expérimental au modèle présenté par Cross *et al.* [26] et schématisé dans la *figure 1* (Portrait-Robot de la dystrophine) (D. Mornet *et al.*, soumis). La même approche permet en outre de comprendre l'origine du fragment de 210 kDa, présent dans beaucoup d'extraits réalisés à partir de pièces d'autopsie et réactif avec des anticorps dirigés contre la partie N-terminale de la dystrophine. La zone de la dystrophine près de l'élément répété 13 serait plus particulièrement sensible à une protéase endogène. Des fragments natifs d'environ 110 à 160 kDa venant du domaine central de plusieurs dystrophines de divers muscles lisses et striés ont maintenant été isolés, indiquant que la charnière située au début de ce domaine était également sensible à la protéolyse. La cinétique de production de ces fragments de dystrophine, résistants aux protéases, est cependant différente d'un muscle à un autre suggérant des différences de structure primaire et tertiaire entre les diverses dystrophines musculaires.

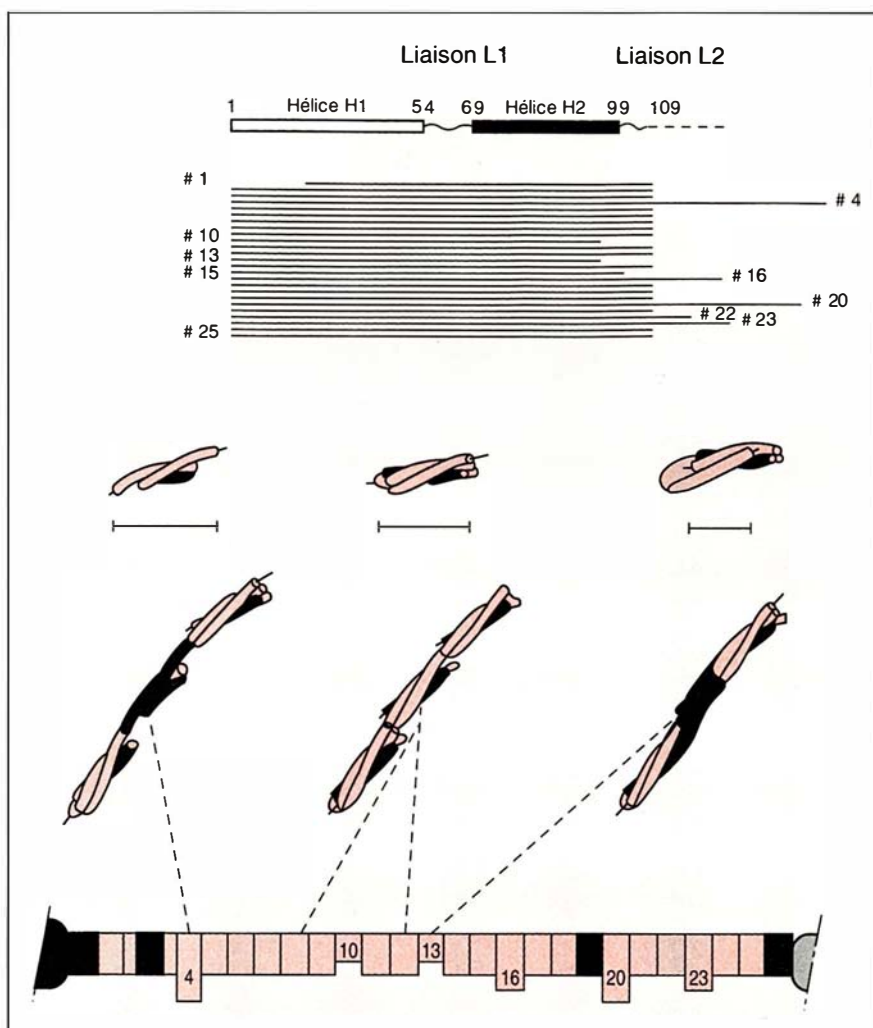


Figure 6. **Prédiction structurales pour le domaine central de la dystrophine** : 25 arrangements répétés en triple hélice, avec quelques segments irréguliers courts et longs [26].

Quelles que soient les divergences quant au positionnement relatif des domaines de discontinuité dans le domaine central des dystrophines, les deux modèles suggèrent que ces molécules doivent adopter une forme allongée et avoir un comportement élastique. Pons *et al.* [16], utilisant une colonne de chromatographie construite avec des anticorps polyclonaux dirigés contre un large segment du domaine central de la dystrophine de muscle squelettique de poulet, ont récemment réussi à isoler la dystrophine du muscle lisse de gésier de poulet. Les images des empreintes de ces molécules après ombrage rotatif ont permis de visualiser, pour la première fois, la molécule de dystrophine, et de confirmer expérimenta-

lement les prédictions faites sur sa structure. Le monomère de dystrophine est un long bâtonnet d'environ 3 à 4 nm d'épaisseur et de 175 (± 15) nm de longueur. Ces monomères s'associent spontanément, soit bout à bout, soit côte à côte, soit des deux manières pour former des structures oligomériques complexes (figure 7, p. 812). Les dystrophines ont donc des propriétés d'auto-association comme les molécules de la famille des spectrines et actinines. Elles s'associent pour former des filaments d'épaisseur légèrement variables, le long desquels sont susceptibles de glisser les molécules individuelles. Ces observations suggèrent que les dystrophines communes seraient l'élément principal d'un filet

élastique ou d'une sorte de résille à l'intérieur de la membrane de la fibre musculaire. Les dystrophines pourraient « coulisser » les unes par rapport aux autres, permettant à l'ensemble du filet de se déformer lors de la contraction et de la relaxation. Son absence dans les muscles de malades DMD modifierait gravement la plasticité de la cellule ainsi que la perméabilité membranaire. Des études récentes confirment cette hypothèse sur un rôle mécanique des dystrophines communes [27]. Des images plus fines (par exemple par coloration négative) sont attendues pour mieux décrire le mode d'organisation des dystrophines. Il faut noter également que les préparations obtenues contiennent souvent, en plus de la dystrophine, des composants copurifiés qui pourraient jouer un rôle dans le processus d'oligomérisation observée.

Les futures études sur le domaine central de la dystrophine devront également tenter de déterminer si, et comment, ce domaine joue un rôle dans la variabilité du phénotype clinique des malades BMD. En effet, ces patients présentent des délétions à localisations et longueurs variables, intéressant souvent le domaine central de la dystrophine. Certains de ces malades ayant une délétion de plus de 35 à 50 % ou une duplication du domaine central [28, 29], sont apparemment peu affectés, alors qu'au contraire, des malades ayant des délétions quasiment ponctuelles, sont gravement handicapés [30]. Cela laisse donc penser que certains points ou régions précis du domaine central de la dystrophine ont une fonction particulière. Un site présentant des analogies de séquence avec le site de la caldesmone qui fixe l'actine a d'ailleurs été repéré entre les résidus 1834-1936 de l'élément répété 15 [31]. Ce site pourrait peut-être fournir un second point sur les dystrophines, permettant leur ancrage à un réseau ou à un faisceau ou près de la membrane [24]. Aucune donnée expérimentale directe n'est cependant disponible.

• **Le domaine riche en résidus cystéines : fixation du calcium (?)**. Les dystrophines ont un module riche en résidus cystéines (résidus 3119 à 3360), situé à la suite de la

RÉFÉRENCES

26. Cross RA, Stewart M, Kendrick-Jones J. Structural predictions for the central domain of dystrophin. *FEBS Lett* 1990 ; 262 : 87-92.
27. Menke A, Jockhush H. Decreased osmotic stability of dystrophin-less muscle cells from the mdx mouse. *Nature* 1991 ; 349 : 69-71.
28. England SB, Nicholson LVB, Johnson MA, *et al.* Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46-percent of dystrophin. *Nature* 1990 ; 343 : 180-2.
29. Angelini C, Beggs AH, Hoffman EP, *et al.* Enormous dystrophin in a patient with Becker muscular dystrophy. *Neurology* 1990 ; 40 : 808-12.
30. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, *et al.* The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy — Correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Gen* 1989 ; 45 : 498-506.
31. Leszyk J, Mornet D, Audemard E, *et al.* Amino acid sequence of a 15 kilodalton actin-binding fragment of turkey gizzard caldesmon : similarity with dystrophin, tropomyosin and the tropomyosin-binding region of troponin T. *Biochem Biophys Res Comm* 1989 ; 160 : 210-6.
32. Cullen MJ, Walsh J, Nicholson LVB, *et al.* Ultrastructural localization of dystrophin in human muscle by using gold immunolabelling. *Proc Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 1990 ; 240 : 197-203.
33. Campbell KP, Kahl SD. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 1989 ; 338 : 259-62.
34. Goodman SR, Krebs KE, Whitfield CF, *et al.* Spectrin and related molecules. *CRC Crit Rev Biochem* 1988 ; 23 : 171-234.
35. Lee CC, Pearlman JA, Chamberlain JS, *et al.* Expression of recombinant dystrophin and its localization to the cell membrane. *Nature* 1991 ; 349 ; 334-6.
36. Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, *et al.* Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 1990 ; 345 : 315-9.
37. Nudel U, Zuk D, Einat P, *et al.* Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. *Nature* 1989 ; 337 : 76-9.
38. Love DR, Hill DF, Dickson G, *et al.* An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* 1989 ; 339 : 55-8.

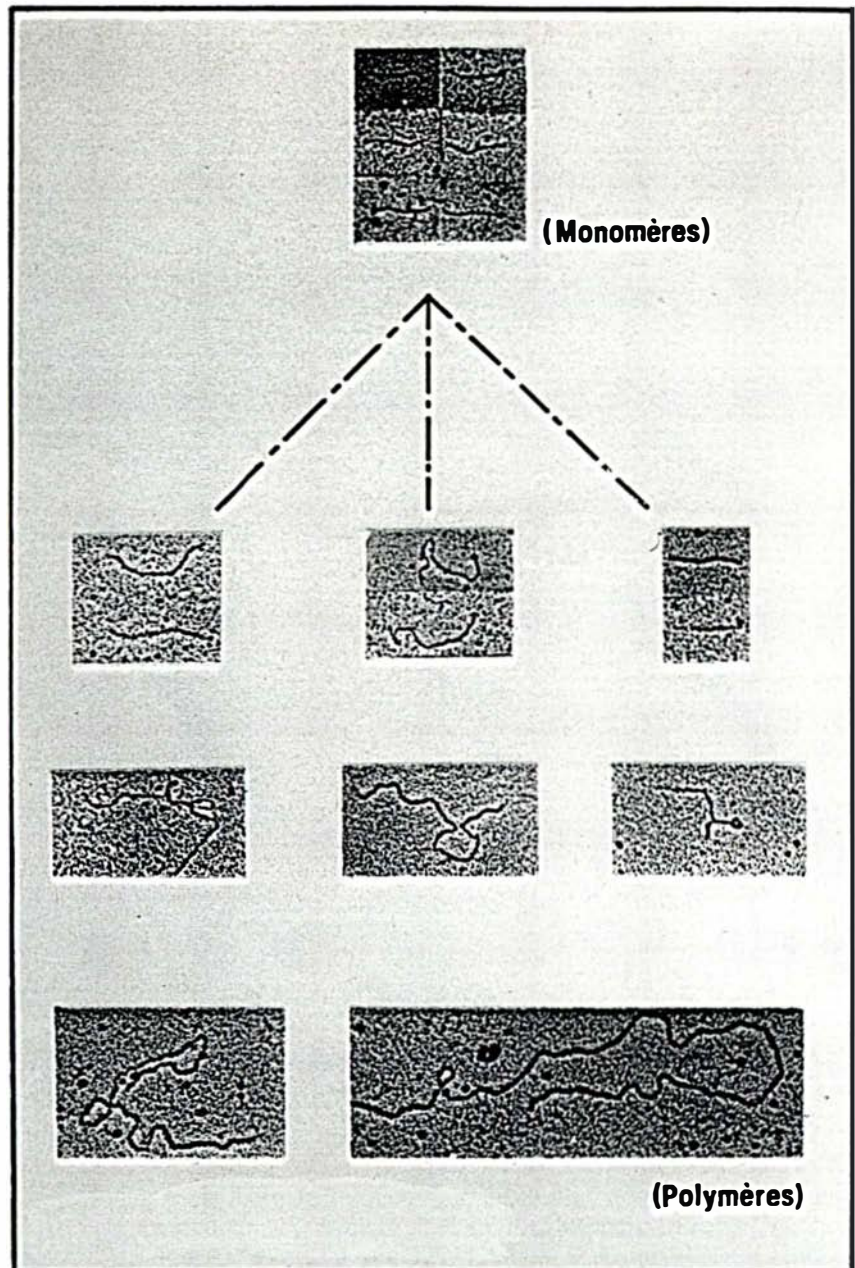


Figure 7. **Auto-association des dystrophines isolées, analysée en microscopie électronique après ombrage rotatif [16].**

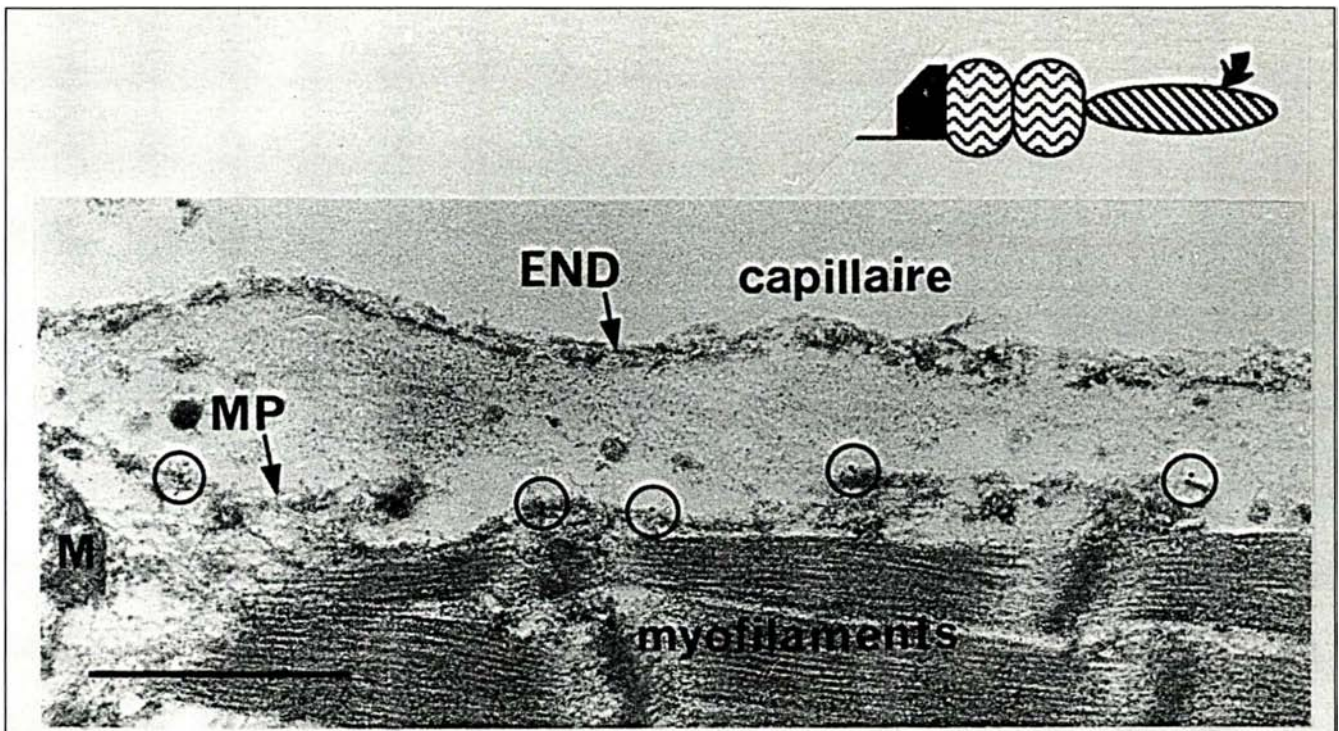


Figure 8. **Interaction du domaine C-terminal de la dystrophine cardiaque de poulet avec la membrane sarcolemmique.** Détection immunocytochimique en microscopie électronique : anticorps anti-dystrophine révélé par un anticorps anti-souris couplé à l'or colloïdal (MP : membrane plasmique ; END : endothélium ; M : mitochondries ; barre = 1 μ m). Les grains d'or, témoignant de la présence de la dystrophine sur la membrane sarcolemmique, sont encadrés (en collaboration avec M.C. Harricane. CRBM/Montpellier I).

dernière charnière du long domaine central. Koenig *et al.* [6] avait reconnu, dans cette région de la dystrophine, des séquences locales à faible analogie structurale avec des motifs EF en doigt de main, présents dans de nombreuses protéines fixant le calcium comme la parvalbumine... Une analogie faible avec le site de fixation du calcium présent dans l' α -actinine a également été constatée. Les tentatives actuellement connues concernant la fixation du calcium par les dystrophines (application de calcium radioactif ou de marqueurs du calcium sur des supports artificiels contenant de la dystrophine ou des fragments natifs ou recombinants) sont demeurées vaines.

• **Le domaine C-terminal pénètre dans la membrane de la fibre musculaire et interagit avec des glycoprotéines de la membrane.**

La séquence des 400 derniers résidus placés à la partie C-terminale des dystrophines (résidus 3361-3685) est

apparemment unique, dans la mesure où une telle séquence n'a pas été retrouvée dans les autres séquences publiées. Les propriétés de ce module original sont paradoxalement assez bien connues. Des études en microscopie électronique ont permis de montrer que cette partie de la molécule de dystrophine interagissait avec la membrane en pénétrant légèrement à l'intérieur de celle-ci [32]. En fait les grains d'or attachés aux anticorps spécifiques de la partie C-terminale de la dystrophine sont répartis plus ou moins régulièrement sur la face interne du sarcolemme (*figure 8*). Utilisant des colonnes d'affinité spécifiques des glycoprotéines, Campbell *et al.* [33] ont montré que la dystrophine interagissait en fait physiquement avec plusieurs glycoprotéines, parties intégrantes de la membrane [32, 33]. Il en a été déduit que, à la manière de la spectrine [34], la dystrophine pénétrait à l'intérieur de la membrane et que sa

partie C-terminale avait des sites plus ou moins spécifiques d'interactions avec ces glycoprotéines constitutives de la membrane. Récemment, Lee *et al.* [35] ont réussi à faire exprimer un ADN complémentaire codant pour la dystrophine de muscle squelettique de souris dans des cellules de rein de singe. Cette dystrophine « recombinante » exogène se place apparemment à la membrane des cellules, suggérant que la molécule a bien intrinsèquement les informations lui permettant d'atteindre son compartiment cellulaire habituel. Il faut enfin noter qu'Ervasti *et al.* [36] ont montré que l'expression de certaines glycoprotéines associées aux dystrophines est diminuée dans les souris *mdx*, animaux dont le muscle squelettique est déficient en dystrophine. Cette carence en des protéines, probablement physiquement associées à la dystrophine, pourrait intervenir directement ou indirectement dans les mécanismes de ces myopathies.

RÉFÉRENCES

39. Bar S, Barnea E, Levy Z, *et al.* A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. *Biochem J* 1990 ; 272 : 557-60.
40. Feener CA, Koenig M, Kunkel LM. Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature* 1989 ; 338 : 509-11.
41. Chelly J, Hamard G, Koulakoff A, *et al.* Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial cells. *Nature* 1990 ; 344 : 64-5.
42. Boyce FM, Beggs AH, Feener C, *et al.* Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1991 ; 88 : 1276-80.
43. Klamut HJ, Gangopadhyay SB, Worton RG, *et al.* Molecular and functional analysis of the muscle-specific promoter region of the Duchenne muscular dystrophy Gene. *Mol Cell Biol* 1990 ; 10 : 193-205.
44. Chelly J, Kaplan JC, Maire P, *et al.* Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. *Nature* 1988 ; 333 : 858-60.
45. Hoffman E, Hudecki MS, Rosenberg PA, *et al.* Cell and fiber-type distribution of dystrophin. *Neuron* 1988 ; 1 : 411-20.
46. Fardeau M, Tome FMS, Collin H, *et al.* Presence of a dystrophin-like protein at the neuromuscular junctions in Duchenne muscular dystrophy and in mdx mutant mice. *C R Acad Sci Serie III-Sciences de la Vie* 1990 ; 311 : 197-204.
47. Chang HW, Bock E, Bonilla E. Dystrophin in electric organ of Torpedocalifornia homologous to that in human muscle. *J. Biol Chem* 1989 ; 264 : 20831-4.
48. Jasmin B, Cartaud A, Ludosky M, *et al.* Asymmetric distribution of dystrophin in developing and adult Torpedo marmorata electrocyte : evidence for its association with the acetylcholine receptor-rich membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 3938-41.
49. Wolff JA, Malone RW, Williams P, *et al.* Direct gene transfer into muscle *in vivo*. *Science* 1990 ; 247 : 1465-8.
50. Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, *et al.* Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblast. *Nature* 1989 ; 337 : 176-9.

La figure 9 tente de résumer les connaissances acquises actuellement quant aux fonctions et à l'organisation des dystrophines communes, présentes sur la face interne du sarcolemme des fibres musculaires. La dystrophine représente bien l'arrangement original de quatre modules, annoncé dans le portrait robot décrit initialement [6]. Trois des quatre structures modulaires ont des fonctions ou des propriétés déjà rencontrées dans d'autres molécules. Le module N-terminal interagit avec l'actine [25]. Le module central répété permet des autoassociations des dystrophines [16]. Le module C-terminal a probablement un rôle original d'attachement à la membrane [32, 36] ; le rôle du module le précédant est toujours inconnu. Cette complexité d'arrangement laisse penser que cette molécule originale n'a pas un rôle trivial de protéine structurale, mais qu'elle exerce des activités modulables dans l'activité mécanique de la cellule contractile. Considérant les analogies importantes entre les dystrophines et certaines

protéines cytosquelettiques présentes dans les globules rouges, il est concevable que des composants, autres que les glycoprotéines et l'actine déjà trouvées, interagissent avec les dystrophines. D'autres composants d'ancrage ou de réseau (type ankyrine, bande 4.1, tropomyosine ou caldesmone...) sont à rechercher. En plus de ces autres composants encore inconnus, des mécanismes contrôlant la structure et l'organisation des dystrophines (telle la phosphorylation détectée dans de nombreux composants analogues) existent probablement et sont à rechercher. En tout cas, les recherches permettant d'analyser les fonctions du « système dystrophique » et ses éventuelles carences en tel ou tel composant doivent être poursuivies. C'est sans doute une des clefs des thérapies futures. Rappelons que les muscles squelettiques des souris *mdx* sont dépourvues de dystrophine comme ceux des patients DMD, et que les souris ne souffrent apparemment pas !

Isoformes de dystrophine ou protéines analogues à la dystrophine

Très rapidement après sa découverte, il est apparu que la dystrophine n'était pas uniquement présente dans le muscle squelettique des mammifères, mais que des protéines homologues à la dystrophine (en anglais *dystrophin-related protein : DRP*) étaient présentes aussi bien dans les autres muscles que dans certaines parties du système nerveux et du cerveau, et d'autres tissus non-musculaires, ce dans des espèces animales très différentes. Il existe encore des incertitudes ou des imprécisions quant au nombre et à l'origine de dystrophines ou protéines homologues exprimées. Les informations disponibles aujourd'hui viennent des études faites, soit à partir des ARN messagers ou des ADN complémentaires des dystrophines, soit au niveau protéique grâce aux générations successives d'anticorps polyclonaux, puis monoclonaux.

Le Tableau II tente de résumer les informations obtenues, au niveau génotypique sur les dystrophines, protéines homologues et fragments...

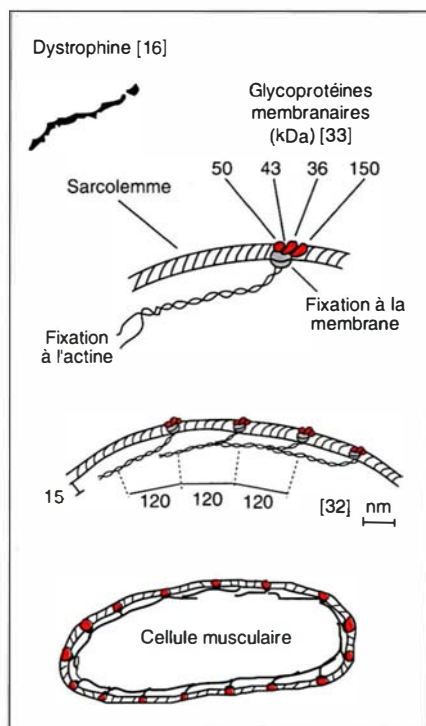


Figure 9. Schéma représentant l'organisation des dystrophines à la périphérie intérieure des membranes des fibres musculaires [16, 32, 33].

Tableau II

CARACTÉRISTIQUES DES TRANSCRITS CODANT POUR DES DYSTROPHINES OU PROTÉINES HOMOLOGUES

Localisation chromosomique	Transcrit (kb)	Détermination séquence	Séquence codante (kb)	Séquence non codante (kb)	Site d'expression abondante	Promoteurs spécifiques	Épissage alternatif	Références
Xp21	14 6,5	totale partielle	11 1,5	3 1,6	muscles, cerveau cerveau, foie, rein, testicule, poumon	muscle, cerveau ?	oui ?	[2, 37] [39]
6q21-qter	13	partielle	?	?	muscle, ?	?	?	[38]
Xq21 dans muscle squelettique humain fœtal								
	14 kb :		1	208		11 264	13 957 pb	[2]
				1		3 685	résidus	
Xp21 dans foie humain								
	6,5 kb :					9 420	pb	[39]
6q21 dans muscle squelettique humain fœtal								
	13 kb :					9 765 11 264	pb	[38]
						_____?_____?_____?_____?_____?_____?_____?_____?_____		

Trois grands types de transcrit, ayant au moins partiellement des séquences homologues en acides nucléiques (et/ou en acides aminés), ont été mis en évidence. Deux transcrits de longueurs différentes (14 kb [2, 6] et 6,5 kb [39] sont issus du chromosome X. Un transcrit de longueur égal à 13 kb est issu du chromosome 6 [38].

— Le(s) transcrit(s) de 14 kb (chromosome X) correspond(ent) à celui isolé dès 1987 d'une banque de muscle squelettique fœtale humaine, dans les études sur la maladie de Duchenne [2]. De tels transcrits ont été trouvés dans tous les muscles des mammifères et dans le cerveau. Ces transcrits existent sous des formes différentes, résultant d'épissages alternatifs spécifiques des différents muscles et tissus [40]. De plus, il est établi que les transcrits des muscles d'une part, et celui (ou ceux) du cerveau d'autre part, sont sous le contrôle de promoteurs différents [37, 40-43]. Seuls les transcrits exprimés dans les muscles squelettiques d'homme et de poulet ont été entièrement séquencés. Des différences en acides aminés dans les parties N et C-terminales

des formes Xp21 de dystrophines exprimées dans le muscle et le cerveau ont également été mises en évidence [37, 40, 41].

— Un transcrit de 6,5 kb (chromosome X) a récemment été isolé de cellules du foie [39]. Ce transcrit court est également présent dans le cerveau, les testicules, les poumons et le rein, mais pas dans le muscle squelettique. Les expériences de protection contre la RNAase montrent que ce transcrit de 6,5 kb a une séquence similaire à celle codant pour les deux derniers domaines C-terminaux de la dystrophine Xp21 : le domaine riche en résidus cystéines et celui responsable de la fixation à la membrane.

— Un transcrit de 13 kb (chromosome 6) a été mis en évidence, en 1989, dans une banque d'ADN complémentaire construite à partir de muscle fœtal humain [38]. Un fragment long de 1,5 kb, issu de ce transcrit autosomique, a été séquencé. La séquence correspondante en acides aminés a plus de 80 % d'homologie avec la séquence de la forme Xp21 de dystrophine.

Cette séquence connue recouvre une partie du domaine riche en résidus cystéines et la totalité du domaine d'attachement à la membrane. L'ADN complémentaire entier n'est toujours pas isolé, et donc aucune information sur les séquences des autres domaines n'a été publiée.

La technique d'amplification de segments d'ADN (PCR) confirme que des fragments d'ADN complémentaires, reconnus par des séquences oligonucléotidiques dérivées de la séquence codante pour la dystrophine Xp21, sont effectivement amplifiés dans tous les muscles et dans de nombreux organes [40]. Les taux d'expression de ces transcrits sont évidemment très variables, parfois très faibles et probablement non significatifs fonctionnellement (transcrits illégitimes) [44].

• **Que sait-on des protéines codées par ces transcrits ?**

Le *Tableau III* (p. 816) résume l'ensemble des données actuelles. Les dystrophines Xp21, protéines codées par les transcrits de 14 kb, ont été naturellement les premières à être détectées dans la plupart des muscles

Tableau III							
CARACTÉRISTIQUES DES DYSTROPHINES ET DES PROTÉINES RELIÉES OU ANALOGUES AUX DYSTROPHINES (A) ET D'UN MODULE C-TERMINAL [39] (B).							
Origine	Transcrit identifié (kb)	Masse mol. apparente (kDa)	Identification	Localisation immunocytoch.	Localisation immuno- empreinte	Isoformes	Références
A.							
Chrom. X	14	400	Dystrophine Xp21	Sarcolemme/muscle neurones/cerveau	Muscles, cerveau	oui	[6, 45]
Chrom. 6	13	400	Protéine reliée à la dystrophine (DRP)	non déterminée	Muscles, cerveau rein...	?	[17]
Chrom. ? ou Chrom. 6	?	400	Dystrophine homologue	Jonction neuro-musculaire vaisseaux	Muscles, vaisseaux, utérus...	oui	[22, 46] et (en cours)
B.							
Chrom. X	6,5	80 (?)	80 kDa	non déterminée	Foie, cerveau...	?	(en cours)

et dans le cerveau de plusieurs espèces animales, grâce aux sérums polyclonaux développés initialement [1, 45]. La *figure 10* présente un exemple de détection des dystrophines chez le poulet. Comme cela a déjà été dit, les dystrophines Xp21 sont localisées à la face interne des sarcolemmes de tous les muscles. Elles sont également exprimées dans les neurones du cortex cérébral et du cervelet, en étant localisées dans les régions post-synaptiques (non montré) [8, 9]. Des isoformes de dystrophine Xp21, différentes dans les muscles squelettiques et lisses, ont été mises en évidence au niveau protéique : différences après protéolyse ménagée ou grâce à des anticorps monoclonaux, spécifiques de la dystrophine Xp21 du muscle squelettique humain mais incapables de reconnaître la dystrophine Xp21 de muscle lisse (Medioni *et al.*, communication personnelle). Il est intéressant de constater que toutes ces dystrophines ont une taille d'environ 400 kDa dans les tissus normaux. Les réductions ou accroissement de tailles de dystrophines, supposées par les études d'épissage alternatif dans les muscles lisses ou dans le cerveau [40], n'ont pas été observées en immuno-empreinte.

Deux types d'approche ont permis de montrer l'existence de protéines reliées ou homologues aux dystrophines mais non issues du chromosome X. Ces protéines homologues ont toutes une taille de 400 kDa, coïncidant avec celle des dystrophines

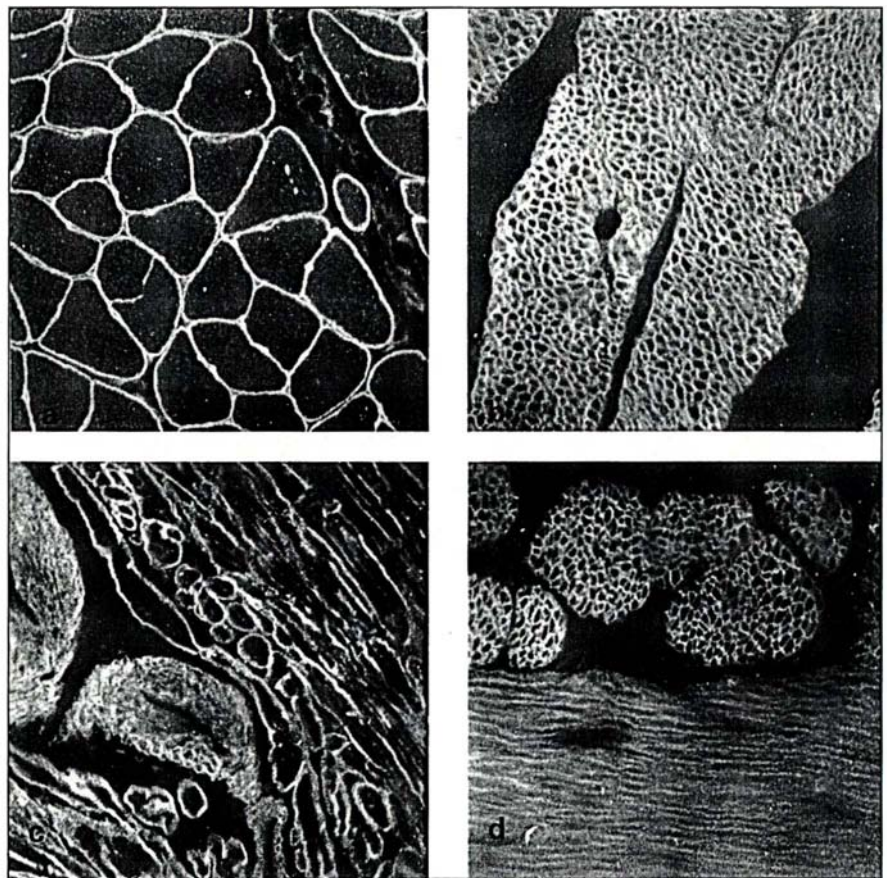


Figure 10. **Analyse immunocytochimique de l'expression des dystrophines dans différents muscles et organes de poulet : squelettique (pectoralis) ; cœur, gésier et intestin. Anticorps polyclonaux comme dans la figure 2.**

Xp21 [1, 45]. Les deux approches ont été faites grâce à des échantillons de muscles ou d'organes de patients ou d'animaux déficients en dystrophines Xp21. La première approche [17] montre qu'un sérum polyclonal, fabriqué à partir d'une protéine recombinante codée par un fragment du transcrit de 13 kb issu du chromosome 6, réagit avec une protéine de 400 kDa, non seulement dans les muscles squelettiques, mais aussi dans de nombreux organes (foie, rein, cerveau...) de patients ou d'animaux normaux ou déficients en dystrophine Xp21. Ces protéines reliées à la dystrophine (DRP) ont donc un spectre d'expression différent des dystrophines Xp21. Les analogies immunologiques ne sont cependant

déTECTABLES que dans la partie C-terminale des molécules, seule disponible pour fabriquer le sérum polyclonal. Aucune étude cytochimique, permettant une localisation subcellulaire des structures immunoréactives avec ce sérum polyclonal, n'a encore été publiée. La seconde approche montre que trois sérums polyclonaux différents, dirigés contre les deux parties distales et la partie centrale de la dystrophine de muscle squelettique de poulet, réagissent positivement avec une protéine de 400 kDa, présente aux jonctions neuro-musculaires dans les muscles normaux et dans ceux de malades ou d'animaux déficients en dystrophine Xp21 [22, 46]. Cela a été en particulier observé dans le muscle squelettique d'un patient

DMD ayant une délétion du gène du locus Xp21 s'étendant sur plus de 52 exons [22]. Cette protéine est donc immunologiquement homologue en trois zones aux dystrophines Xp21 mais ne peut être codée par le gène en Xp21. Les anticorps monoclonaux développés très récemment permettent de distinguer de la même façon les deux groupes de dystrophines homologues. La figure 11 en donne un exemple sur un patient DMD ayant une large délétion. L'application de ces deux populations d'anticorps monoclonaux à d'autres tissus ou organes permet d'ores et déjà d'affirmer que des protéines homologues de la dystrophine sont également exprimées dans certains muscles lisses vasculaires ou d'organes (cer-

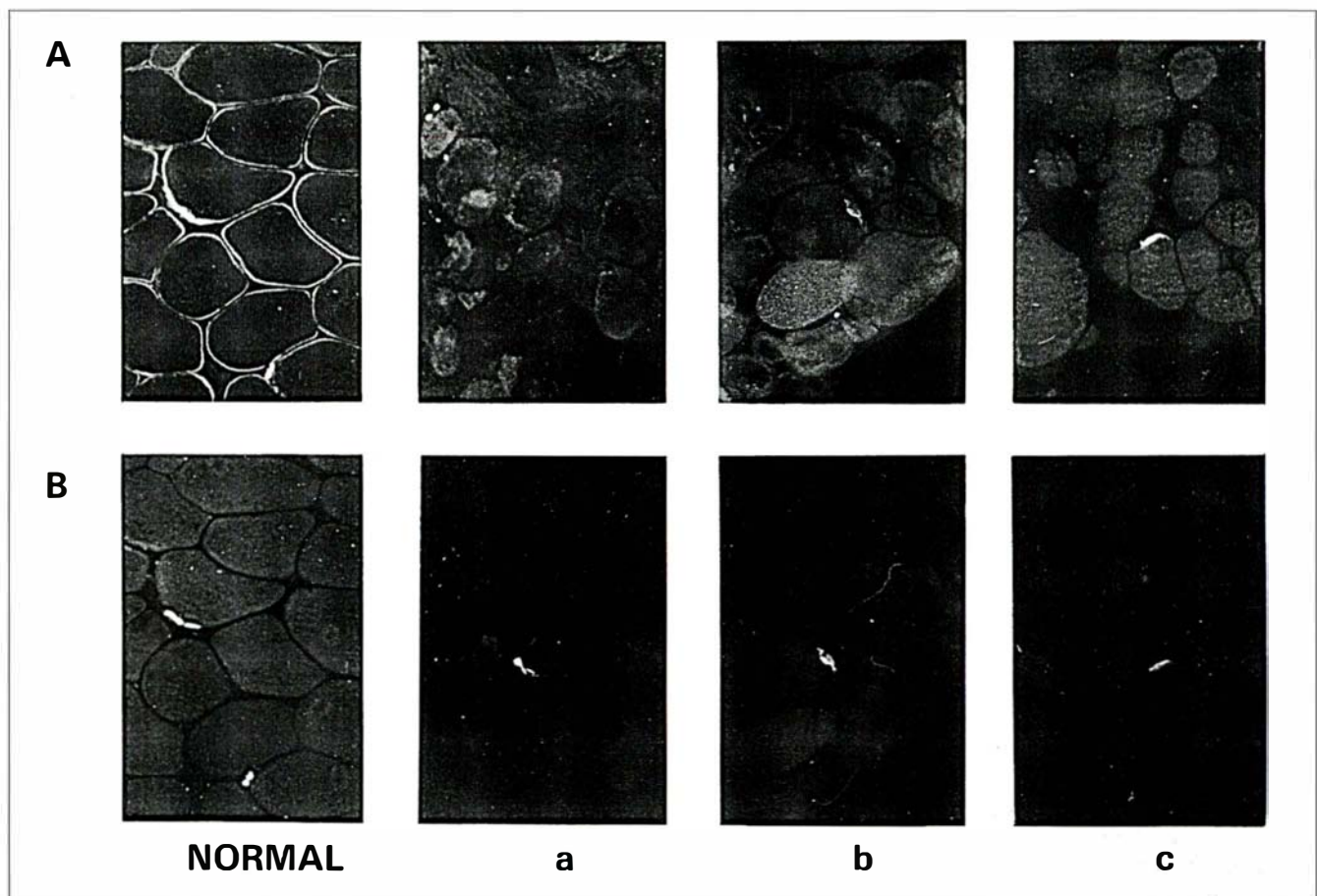


Figure 11. **Analyse de l'expression des dystrophines Xp21 et dystrophines homologues à la périphérie des fibres musculaires et aux jonctions neuromusculaires au moyen d'anticorps monoclonaux de régions et de spécificité différentes.** (A) détection immunocytochimique de la dystrophine, et (B) détection spécifique des jonctions neuromusculaires à l'aide de la bungarotoxine. DMD : biopsies d'un muscle malade de patient largement délété dans le gène Xp21 analysé avec deux anticorps monoclonaux de la région C-terminale : (a) spécifique de la dystrophine du locus Xp21 et (b) reconnaissant également une dystrophine homologue ; (c) analyse avec un anticorps de la région centrale reconnaissant les deux types de dystrophines.

veau, utérus...) dans des muscles normaux ou déficients en dystrophine commune (Augier *et al.*, Medioni *et al.*, travaux soumis).

Il existe donc bien une famille de protéines analogues aux dystrophines Xp21. Les dystrophines des deux familles (liées à l'X et autosomiques), ont, à la fois, des épitopes communs et différents sur toute la longueur. Dans l'état actuel des connaissances, on peut penser que la structure globale des protéines analogues aux dystrophines, codées par un gène non localisé en Xp21, est donc très proche de celle des dystrophines Xp21. Elles sont parfois coexprimées dans certains tissus, mais pas toujours. On ne sait pas si les protéines de cette famille sont codées uniquement par le gène *DRP* du chromosome 6 [17, 38], ou s'il existe encore un autre gène non identifié. Il pourrait s'agir réellement d'isoformes comme cela est le cas pour la plupart des protéines contractiles qui sont codées par des gènes non alléliques, situés ou pas sur des chromosomes différents. Une autre hypothèse serait que ces protéines nouvelles représentent un arrangement original de certains modules structuraux (et fonctionnels) présents dans les dystrophines Xp21 combinés avec un ou plusieurs module(s) nouveau(x) non encore identifiés. La nature dispose clairement de divers modules fonctionnels (par exemple, module fixant l'actine, module de fixation à la membrane...) et les assemble d'une manière originale et variée pour créer de grandes molécules multifonctionnelles (spectrine, titine, twitchine, fibrine... [24]). Les travaux en cours sur l'expression d'une protéine de 80 kDa environ dans le cerveau, probablement codée par le transcrit de 6,5 kb (voir plus haut), donne un support expérimental à cette hypothèse (Nudel *et al.*, communication personnelle). Il faut enfin noter que des protéines homologues à la dystrophine ont été mises en évidence dans des espèces animales très diverses (torpille, urodèle...). Une mention particulière doit être faite à la protéine analogue de la dystrophine trouvée dans l'organe électrique de la torpille [47, 48]. On ne sait pas si cette protéine est fonctionnellement semblable à celle exprimée spécifiquement à la jonction neu-

romusculaire. En tout cas, puisqu'on les retrouve toutes deux plus particulièrement dans des zones cellulaires impliquées dans des transferts électriques, il est tentant d'imaginer qu'elles auraient un rôle différent du rôle mécanique attribué aux autres dystrophines Xp21.

Bilan et perspectives

Après trois ans, on peut donc écrire que les hypothèses sur les fonctions de la dystrophine, déduites initialement des analyses de séquence d'acides nucléiques [6], ont commencé à recevoir un support expérimental. A cela, il faut ajouter la mise en évidence de deux familles de dystrophines et la présence de composants associés aux dystrophines. Ces protéines associées jouent probablement un rôle dans la maladie [36], même si la non expression ou l'expression réduite et/ou tronquée de la dystrophine du locus Xp21 est toujours la cause première des troubles cliniques observés chez les malades BMD et DMD. Il faut donc parler maintenant plutôt du système « dystrophine » que de la dystrophine. L'analyse des publications sur la dystrophine depuis 1987 montre que les équipes à l'origine du succès de la génétique inverse, spécialisées en génétique et biologie moléculaire, ont participé très activement aux progrès actuels des connaissances. Le relai a en même temps été repris par quelques équipes nouvelles, en général impliquées depuis longtemps dans l'étude physico-chimique et la cytologie des systèmes contractiles ou motiles.

Avant de conclure, nous souhaitons évoquer brièvement les conséquences des progrès réalisés dans l'identification, la caractérisation et la localisation des dystrophines et protéines homologues, ainsi que dans la découverte de protéines associées aux dystrophines, sur les pratiques diagnostiques et les perspectives thérapeutiques :

• Conséquences pour le diagnostic des patients DMD/BMD.

L'existence de plusieurs transcrits, codant pour plusieurs isoformes de dystrophine ou protéines homologues, incite, en particulier le clinicien, à évaluer très attentivement les limites des deux outils principaux utilisés

pour le diagnostic des patients DMD/BMD : les anticorps anti-dystrophines et les techniques d'amplification des séquences de gène. En effet, toutes les biopsies de muscle squelettique contiennent quelques vaisseaux ou même quelques jonctions neuro-musculaires. Seul l'emploi d'anticorps monoclonaux strictement spécifiques des formes Xp21 des dystrophines permet d'éviter les faux positifs, pouvant mener à un diagnostic erroné (Augier *et al.*, soumis). Comme cela a été montré dans l'exemple sur les jonctions neuro-musculaires (*figure 11*), l'emploi combiné de deux anticorps correspondant à des régions différentes de la dystrophine Xp21 en immunocytochimie et en immuno-empreinte est nécessaire pour déterminer la localisation et la taille de la molécule analysée. Les éventuelles dégradations de la molécule de dystrophine sont alors détectables. Des anticorps monoclonaux performants sont maintenant disponibles... En ce qui concerne le diagnostic génétique par PCR, une attention particulière doit être portée au choix des sondes et au nombre de cycles d'amplifications. Des segments analogues à la dystrophine Xp21, minoritaires et plus ou moins bien reconnus par les sondes oligonucléotidiques utilisées, peuvent être amplifiées dans des zones où on ne connaît pas les séquences des analogues des dystrophines.

• Perspectives thérapeutiques

Le progrès le plus tangible de la découverte du gène est sans doute la mise au point d'un diagnostic anténatal fiable. Il faut bien reconnaître que les progrès fondamentaux faits sur les dystrophines n'apportent toujours pas d'explications bien précises sur les mécanismes exacts de la maladie chez les patients dépourvus de la dystrophine Xp21, ni d'indications quant à des voies thérapeutiques nouvelles. On ne sait toujours pas si le nombre élevé de malades DMD atteints de degrés divers de retard mental est lié à tel ou tel défaut du gène du locus Xp21. Les observations sur la spécificité de la dystrophine Xp21 du cerveau et celles très récentes sur le transcrit court de 6,5 kb [39] pourraient apporter prochainement quelques indications à ce sujet. Bien que les dystrophines et certaines

protéines des érythrocytes (spectrine, ankyrine...) présentent de solides analogies structurales et fonctionnelles, il apparaît cependant difficile de tirer des informations utiles à partir des maladies des érythrocytes dues à des déficiences en tel ou tel composant analogue [34]. Les analogies physiopathologiques dues à une délétion d'un composant analogue impliqué dans la stabilité mécanique et la forme de deux cellules aussi spécialisées et différentes qu'un globule rouge et une fibre musculaire, seront sûrement très difficiles à décrypter. Notons enfin que, jusqu'à présent, aucune symptomatologie n'a été mise en évidence en ce qui concerne les protéines analogues aux dystrophines (de type DRP). Si ces dernières sont effectivement des isoformes des dystrophines, il est possible de penser que certaines caractéristiques du gène du *locus* Xp21 (en particulier la taille, la sensibilité aux mutations...) devraient être retrouvées dans les gènes correspondants. Leur caractère autosomique compliquera sans doute la recherche au plan phénotypique. Des recherches systématiques sur des possibles implications de ces gènes dans certaines affections neuromusculaires devraient être rapidement entreprises.

Cela étant, les progrès fondamentaux réalisés dans la connaissance des dystrophines sont tout à fait nécessaires aux projets en cours ou prévus de thérapie. Les tentatives actuelles consistent soit à fabriquer et à injecter des dystrophines dans des muscles déficients [49], soit à transférer des myoblastes normaux dans des muscles déficients [50], soit à « fabriquer » des souris *mdx* transgéniques (Lee et Caskey, communication personnelle). Les minidystrophines, exprimées chez des malades BMD à phénotype léger [28], représentent un prototype prometteur pour ces approches. Toutes ces démarches de « sauvetage » consistent donc à injecter une molécule ou une machinerie encore mal connue ! Une meilleure connaissance des composants associés aux dystrophines, une définition plus fine des zones essentielles du long domaine central de la dystrophine, une meilleure compréhension de l'expression et du rôle des diverses dystrophines... augmenteront par conséquent les chances de succès de telles entreprises ■

m/s n° 8, vol. 7, octobre 91

Summary

Dystrophin, three years after its discovery

We present the general features of the dystrophin molecule and the main immunological tools used for its study. The initial hypotheses on its structural arrangement in 4 different domains have now received experimental support [6]. Some residues of the N-terminal domain interacts with actin [25]. The long central domain has different discontinuous, protease-sensitive areas [26]. Dystrophin molecules present the same capacity of self-association in oligomeric structures as other cytoskeletal proteins of the spectrin superfamily [16]. The C-terminal domain is arranged close to the cytoplasmic internal face of plasma membranes [32] and interacts with a few membrane integral glycoproteins [36]. Dystrophin molecules form a complex interconnecting meshwork essential to muscle cell function. Different dystrophin isoforms and/or dystrophin related proteins (DRP) are either exclusively expressed or co-expressed in different muscles or tissues like brain and liver... These isoproteins are issued from different transcripts either from genes located on at least two different chromosomes (X and 6), or through alternative splicing. The progressive development of monoclonal antibodies specific to the different dystrophin isoforms could enable more informative immunodiagnoses of the dystrophin deficiency in Duchenne and Becker patients.

Remerciements

Nous souhaitons remercier Mmes M. Anjal et A. Robert pour leur excellente aide technique. Le laboratoire est soutenu financièrement par l'Inserm, le Cnrs, la Sécurité Sociale et l'Association Française contre les Myopathies (AFM). N.A. est boursière de l'AFM.

TIRÉS A PART

J.J. Léger.