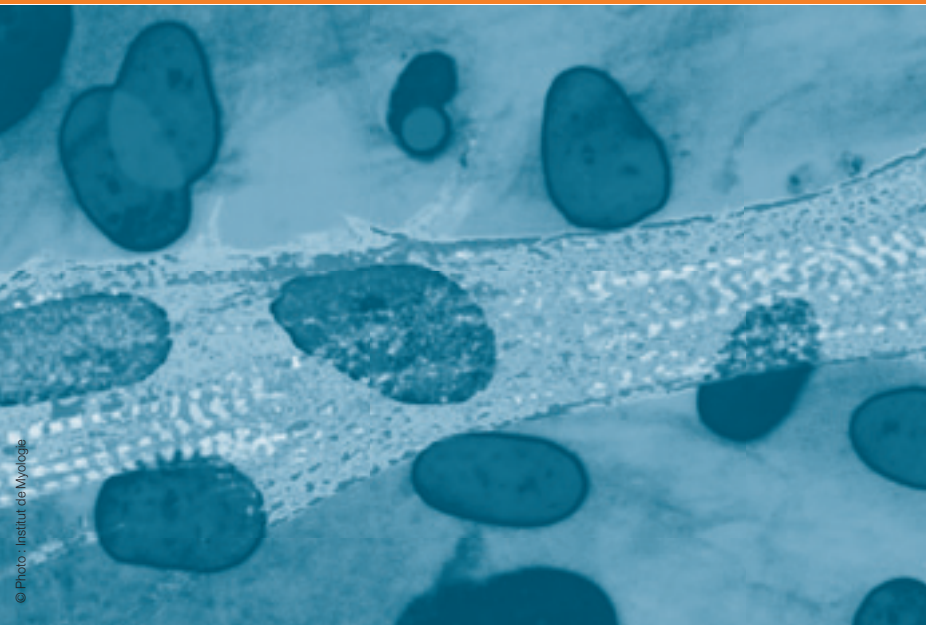


COMPTE RENDU FLASH

Myology 2008

26 AU 30 MAI 2008

Marseille



Myology 2008

au carrefour de la recherche et de la médecine

Du 26 au 30 mai 2008, a eu lieu à Marseille la 3^e édition du Congrès International de Myologie organisé par l'AFM, avec en parallèle de nombreux colloques (dont le Colloque Jeunes Chercheurs) et symposiums. Près de 900 participants étaient présents pour échanger leurs expériences et leurs connaissances sur le muscle.

Deux axes - recherche fondamentale et recherche clinique - ont été développés chaque jour à travers des thématiques transversales ou par pathologie. De nombreuses communications étaient orientées vers des perspectives thérapeutiques ou des essais sur l'homme.

Au programme de son dernier jour, Myology 2008 partageait la mise au point de méthodes d'évaluations des essais cliniques avec le "5^e Congrès International de Rééducation dans les maladies neuromusculaires".

Expérimentations **cellulaire** **et animale**

FSH : identification d'acteurs majeurs *DUX4, PITX1 et DUX4c*

La dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale (FSH) est considérée comme une maladie de régulation génique, dont le défaut génétique consiste en une diminution des répétitions D4Z4. Les patients atteints de FSH ont un nombre de copies D4Z4 compris entre 1 et 10, tandis que les sujets non affectés possèdent en règle générale de 11 à 150 copies. L'association des répétitions D4Z4 avec la matrice nucléaire et l'hétérochromatine crée une structure chromatiniennne peu favorable à la transcription des gènes. La diminution du nombre de répétitions provoquerait un détachement du locus 4q35 de la zone d'hétérochromatine et lèverait l'inhibition de la transcription par l'expression des activateurs contenus dans les D4Z4.

L'expression du gène du *Double Homeobox* (*DUX4*) dans la région des répétitions D4Z4) est détectée dans les myoblastes de la FSH, mais pas dans les myoblastes contrôles. De même, la surexpression de *DUX4* induit la mort cellulaire.

D'autre part, le gène appelé *PITX1* (*Paired-like homeodo-*

main transcription factor 1) est activé spécifiquement dans les muscles atteints et non atteints de patients présentant une FSH. Chez la souris transgénique modèle, *PITX1* induit une atrophie du muscle squelettique. Mais comment *DUX4* (en 4q35) et *PITX1* (en 5q311) peuvent-ils s'associer pour déclencher la maladie ?

Une collaboration de recherche belge et américaine a permis d'élucider le mécanisme moléculaire. La nocivité du gène *DUX4* s'exerce insidieusement. Il exprime une protéine particulière (facteur de transcription) qui a pour effet d'activer directement le gène *PITX1* en se liant à lui. De plus, la protéine *PITX1* produite peut à son tour activer d'autres gènes menant à l'atrophie musculaire. Cette activation de gènes en cascade suggère une piste pour des approches thérapeutiques visant à bloquer les gènes *DUX4* et *PITX1*. L'inhibition de l'expression de *DUX4* par siARN (*silent RNA*) pourrait constituer une approche thérapeutique dans la FSH.

In vitro, les deux protéines (*DUX4* et *PITX1*) sont détectées par immunofluorescence dans le noyau des myotubes FSH. Ces données démontrent que *DUX4* et *PITX1* sont précocement impliqués dans la FSH. L'équipe belge

a aussi identifié le gène centromérique homologue *DUX4c* de la région D4Z4 et a montré que la surexpression de *DUX4c* induit une prolifération cellulaire et inhibe la différenciation des myotubes. Ces résultats suggèrent le rôle de *DUX4c* dans la régénération musculaire qui pourrait être perturbée soit par une activation soit par une délétion du gène *DUX4c*.

Myostatine et différenciation musculaire

Chez l'embryon et le fœtus, une population de cellules progénitrices musculaires participe à la croissance de l'ensemble des muscles squelettiques. Ces cellules, qui ont la même origine que les cellules satellites (cellules souches musculaires de l'adulte), vont se multiplier et se différencier pour donner le muscle normal. La croissance du muscle est déterminée par un équilibre entre la prolifération et la différenciation de ces cellules. Depuis 2007, il a déjà été démontré que le facteur Notch est impliqué, à la fois dans la prolifération et dans la différenciation des cellules progénitrices musculaires embryonnaires. Récemment, des travaux sur la myostatine ont montré qu'elle induit la différenciation des cellules progénitrices musculaires. Ainsi, suite à une suractivation à long terme de la myostatine, l'équilibre de la croissance musculaire est rompu à cause d'une différenciation excessive et pathologique des cellules progénitrices musculaires.

La mise en évidence de ce mécanisme permet une éventuelle utilisation de la cible myostatine à des fins thérapeutiques par le développement d'anticorps anti-myostatine ou contre son récepteur.

Mésoangioblastes ?

Les mésoangioblastes sont des cellules progénitrices vasculaires, capables de se différencier en différents types de mésoderme incluant le muscle squelettique. Des mésoangioblastes adultes humains (prélevés des biopsies musculaires) ont été récemment isolés et multipliés *in vitro*. Ils correspondent à un sous-ensemble de péricytes (cellules localisées dans les parois des vaisseaux sanguins) ayant la particularité de se développer de façon spontanée et avec une grande efficacité en muscles squelettiques. Il s'agit d'un programme endogène propre aux cellules musculaires squelettiques, qui contribue à la formation des fibres musculaires squelettiques et des cardiomyocytes chez les sujets normaux après la naissance.

Mésoangioblastes et DMD : vers un essai clinique

Une injection par voie intra-artérielle de mésoangioblastes de chiens sains entraîne une amélioration histologique chez le chien dystrophique. La dystrophine est exprimée dans 5 à 90% des fibres musculaires. Suite à ces résultats encourageants, un essai clinique de phase I/II est en préparation pour étudier la sécurité (à court et long terme) de l'injection intra-artérielle de mésoangioblastes chez des patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Il s'agit d'une allo-transplantation utilisant des donneurs de cellules à partir d'un typage HLA du donneur. Les chercheurs envisagent de contourner les problèmes de faisabilité de l'essai chez l'homme par divers moyens :

Myosinopathies : un groupe émergent de myopathies

Les myosinopathies qui affectent primitivement le filament épais de la myosine peuvent être héréditaires ou acquises. Elles sont dues aux mutations dans les gènes codant la chaîne lourde de myosine du muscle squelettique (*MyHC*). La plupart des mutations décrites dans la *MYH7* (*MyHC* cardiaque) sont associées à une cardiomyopathie dilatée/hypertrophique, sans atteinte du muscle squelettique. Les formes cliniques de ces pathologies sont variées et de gravité très variable.

Les mutations dans le gène codant la chaîne lourde de la fibre rapide (IIa) de myosine (*MYH2*) peuvent causer une myopathie avec rétractions congénitales bénignes et ophtalmoplégie externe, avec implication des fibres 2A (présence possible de vacuoles bordées). Les mutations dans le gène *MYH3* (*MyHC* embryonnaire) sont associées à des syndromes d'arthrogrypose distale (syndrome de Freeman-Sheldon et Sheldon-Hall), avec ou sans faiblesse musculaire. Les mutations dans le gène codant la chaîne lourde de myosine périnatale (*MYH8*) peuvent causer des rétractions congénitales avec trismus/pseudocamptodactylie. Les mutations dans le gène codant la chaîne lourde de la fibre lente de myosine (*MYH7*) peuvent causer une cardiopathie ou une myopathie ou les deux pathologies associées (myopathie distale de Laing à début précoce et myopathie de stockage à myosine). Enfin une forme grave de myopathie acquise, la myopathie quadriplégique aiguë (AQM ou *acute quadriplegic myopathy*) est due à une perte importante de myosine.

injection autologue, immortalisation des mésoangioblastes, chromosome artificiel contenant le gène complet de la dystrophine pleine longueur.

SMA : une barrière franchie

L'une des limites de la thérapie génique dans l'amyotrophie spinale (SMA) réside dans la difficulté des vecteurs (transportant le gène thérapeutique) à franchir la barrière hémato-encéphalique pour atteindre les motoneurons de la moelle épinière. Pour la première fois, des travaux réalisés chez des modèles de chats ont montré qu'un vecteur AAV (*adeno-associated virus*) est capable de passer de la circulation sanguine à la moelle épinière. Ces résultats sont à confirmer par des études plus poussées.

Saut d'exon chez le chien GRMD

La perfusion d'AAV-U7 d'un membre isolé chez le chien *golden retriever* (GRMD) modèle de la myopathie de Duchenne, a permis la production d'une quasi-dystrophine fonctionnelle ainsi que le doublement en deux mois de

Une "mini-dysferline" en cause

Le cas d'un patient atteint d'une forme très modérée de dysferlinopathies a été présenté.

La maladie est due à une mutation particulière dans le gène de la dysferline. Cette mutation, qui respecte le cadre de lecture, permet de produire une protéine tronquée mais partiellement fonctionnelle, nommée "mini-dysferline". Cette découverte a non seulement des implications pour le diagnostic des patients mais également pour le développement de traitements : transfert du gène de mini-dysferline ou saut d'exon.

Les dysferlinopathies regroupent différentes maladies neuromusculaires dues à un déficit en dysferline comme la myopathie distale de Miyoshi ou la dystrophie musculaire des ceintures LGMD 2B.

la force musculaire. De nouveaux modes d'administration *via* le cœur (administration intra-ventriculaire ou cardiopulmonaire) sont étudiés pour améliorer l'efficacité et la sécurité du traitement.

Essais pharmacologiques

Myozyme® : résultats à confirmer

Les résultats de l'essai multicentrique international de phase II/III sur le traitement de la maladie de Pompe adulte avec le Myozyme® ont été présentés pour la première fois en France dans le cadre du symposium Genzyme organisé lors du Congrès Myologie 2008.

Dans cet essai contrôlé *versus* placebo, l'efficacité d'un traitement de 18 mois chez 90 patients avec une forme modérée de maladie de Pompe adulte a été évaluée.

D'après les résultats préliminaires, Myozyme® a stabilisé l'évolution de la maladie.

Parmi les critères d'évaluation, une amélioration significative a été observée dans le groupe traité par Myozyme® pour les deux critères : distance de marche pendant 6 minutes et capacité vitale. Des effets secondaires modérés ont été observés dans les deux groupes, à l'exception de la réaction allergique chez trois personnes traitées par Myozyme® qui ont dû interrompre l'essai.

Une amélioration observée, durant les 6 mois à venir, chez les patients du groupe placebo qui vont prendre le véritable traitement, permettrait de conclure à une véritable effi-

Progeria et laminopathies

La progeria, appelée aussi syndrome de Hutchinson-Gilford, est une laminopathie. Elle est causée par un défaut du gène *LMNA* codant les lamines A/C.

Ces anomalies se traduisent notamment par l'accumulation toxique dans les cellules de pré-lamine A, la forme immature de la protéine lamine A.

Depuis la découverte de l'implication de ce gène *LMNA* dans la dystrophie musculaire d'Emery-Dreyfus en 1999, plus de 10 maladies héréditaires touchant différents tissus ont été identifiées comme étant liées de façon directe ou indirecte à la dysfonction des lamines A/C : une forme de neuropathie périphérique (maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2B1), une forme de myopathie des ceintures (LGMD 1B), une forme de lipodystrophie partielle familiale, une forme de dysplasie mandibulo-acrale, des maladies du vieillissement prématuré et récemment de nouveaux syndromes : syndrome cœur-main de type slovène et une forme atypique du syndrome de Werner.

cacité de Myozyme® dans la forme adulte de la maladie de Pompe.

La maladie de Pompe ou glycogénose de type II est liée à un déficit en maltase acide (alpha-glucosidase acide ou GAA), une enzyme lysosomale. L'enzymothérapie substitutive par une enzyme recombinante Myozyme® (alpha alglucosidase) est déjà utilisée dans le traitement de la forme infantile de cette maladie.

Progeria : un protocole clinique

Un protocole clinique concernant la progeria, une maladie rare du vieillissement accéléré, va être mis en place. Cet essai qui devrait concerner 15 enfants en Europe a comme objectif de tester l'efficacité de la combinaison de deux molécules (déjà commercialisées pour d'autres indications) pour ralentir la progression de cette maladie qui conduit au décès avant l'âge de 15 ans.

Cinq ans après l'identification du gène (2003), les mécanismes physiopathologiques de cette maladie incurable sont mis à jour.

La progeria est due à l'accumulation dans les cellules d'une protéine tronquée, la progérine qui est une prélamine A tronquée farnésylée. La toxicité de la progérine est due à la présence d'un acide gras qui reste fixé à la progérine (farnésylation ou modification post-traductionnelle par des résidus lipidiques) alors qu'il est éliminé dans les cellules normales.

Des études *in vitro* réalisées sur des cellules de malades et des tests précliniques chez la souris ont montré que la combinaison d'une statine (HMG-CoA reductase, indiquée dans le traitement des hypercholestérolémies) et d'un aminobisphosphonate (inhibiteur de la farnésylation, indiqué dans les ostéosarcomes) peut prévenir la fixation de l'acide gras à la progérine et donc réduire sa toxicité et ralentir l'évolution de la maladie.

Thérapie génique

Méganucléase : "chirurgien" du gène

Une méganucléase est une molécule (protéine) qui coupe l'ADN en un endroit spécifique de l'ADN double brin sur le chromosome. Une fois que l'ADN est coupé, il est réparé par une molécule d'ADN fabriquée spécifiquement (appelée matrice de réparation) qui sera utilisée comme matrice nucléique pour réparer la cassure. La matrice de réparation comporte la zone génomique à réparer avec les séquences homologues. En alliant la capacité des méganucléases à "couper" l'ADN sur un gène spécifique de manière précise à la possibilité de "coller" la matrice de réparation à l'endroit de la coupure, il est possible de restituer un gène correct. Les méganucléases contribuent à rendre l'approche de thérapie génique plus sûre. Il ne s'agit pas d'insertion aléatoire d'un gène médicament, mais de la correction du gène déficient lui-même : une réparation exacte et définitive par recombinaison homologue.

En 2007, une méganucléase à but thérapeutique a été conçue pour cibler le gène *IL2RG* responsable d'une immunodéficiance sévère liée au chromosome X (enfants-bulles X-SCID).

Théoriquement, les méganucléases pourraient être utilisées pour une large gamme d'applications biotechnologiques et thérapeutiques : autres immunodéficien-

ces innées, maladies génétiques (telles que les maladies hématologiques comme l'anémie falciforme, l'hémophilie), cancers, maladies cardiovasculaires, maladies infectieuses....

Nanoparticules : du nouveau pour le saut d'exon

Des nanoparticules revêtues d'une très faible dose d'oligonucléotides antisens (molécules qui permettent de « sauter » les parties erronées du gène de la dystrophine) ont été administrées à des souris modèles de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Elles permettent de délivrer directement le traitement aux cellules du cœur et des muscles squelettiques et d'y restaurer partiellement la production de dystrophine, même 60 jours après l'injection pour les muscles squelettiques.

La même dose d'oligonucléotides injectée à nu n'a donné aucun effet.

Une nanoparticule est par définition un assemblage de quelques centaines à quelques milliers d'atomes. Dans cette étude, les nanoparticules sont en polyméthyle méthacrylate - un matériau biocompatible - d'environ 400 nanomètres de diamètre (400 millièmes de millimètre). Des travaux sont en cours pour rendre ces nouveaux vecteurs encore plus performants.

DMD et saut d'exon : trois essais cliniques en cours

• Injection dans le muscle

Un essai de phase I/II mené en Angleterre par le consortium MDEX évalue la tolérance d'une injection intramusculaire de morpholinos (oligonucléotides de synthèse antisens, nommés AVI-4658 et induisant le saut d'exon 51) chez 9 garçons atteints de Duchenne âgés de 12 à 17 ans. Les patients sont répartis dans trois groupes correspondant à trois doses différentes. Les premiers résultats sont attendus pour fin 2008.

Des recherches précliniques sur un traitement par voie systémique chez des souris *mdx* ont montré que des injections par voie sous-cutanée ou par voie intraveineuse présentaient une efficacité équivalente. Par contre, une dose de morpholinos en injection unique hebdomadaire est moins efficace que celle faite en 4 injections par semaine. Ces données précliniques seront probablement prises en compte dans la poursuite de l'essai dans le futur par voie systémique.

• Voie systémique

L'inclusion de premiers patients dans l'essai de phase I/II destiné à tester l'efficacité du saut d'exon par oligonucléotides anti-sens ciblant l'exon 51 (nommés PRO051) dans la myopathie de Duchenne (DMD) a été annoncée. Il fait suite aux résultats positifs (publiés fin 2007) d'un premier essai de phase I réalisé chez 4 enfants atteints de DMD ayant reçu une injection unique de PRO051 dans un muscle de la jambe. Pour ce nouvel essai, la voie systémique par injection sous-cutanée est utilisée pour permettre une distribution généralisée. Un des critères évalués est l'expression de la dystrophine dans les biopsies musculaires. L'essai est mené dans trois centres à Leiden (Pays-Bas), Gotteborg (Suède) et Leuven (Belgique).

• Voie orale

Le PTC124, un médicament expérimental administré par voie orale pour le traitement des maladies génétiques induites par des mutations non-sens, a été présenté lors du symposium PTC organisé dans le cadre du congrès.

Une étude clinique de phase IIb dans la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et dans la dystrophie musculaire de Becker (DMB) a été récemment lancée en France, en Belgique et en Suède. Elle doit inclure 165 patients atteints de DMD/DMB uniquement porteurs d'une mutation non-sens du gène de la dystrophine. Elle vise à évaluer la tolérance à long terme et l'efficacité clinique de

la molécule PTC124. Trois centres de référence français (Paris, Nantes et Marseille) sont impliqués. Pour les besoins de cette étude, des patients seront recrutés dans de nouveaux centres d'investigation clinique européens au cours des mois à venir.

Dans les modèles précliniques, il a été mis en évidence que le PTC124 permettait de réguler les processus de contrôle post-transcriptionnels en restaurant des protéines fonctionnelles. Ces processus se produisent à l'issue de la copie d'une molécule d'ARN à partir d'une séquence d'ADN. Ils fournissent une possibilité d'intervention thérapeutique dans un large éventail de maladies génétiques via la modulation des taux de protéines.

Dans les études cliniques de phase I, le PTC124 a été généralement bien toléré et n'a pas induit la translecture de codons stop naturels dans les ribosomes. Le PTC124 a validé la preuve pharmacodynamique du concept dans les études cliniques de phase IIa réalisées dans la dystrophie musculaire de Duchenne induite par des mutations non-sens et dans la mucoviscidose. Il peut potentiellement être utilisé pour traiter un vaste éventail d'autres maladies génétiques induites par une mutation non-sens.

PTC124 et mutations non-sens

Les mutations non-sens inactivent la fonction des gènes et sont connues pour être responsables d'environ 10% de maladies génétiques (plus de 2 400 ont leur gène connu). Les mutations non-sens sont des altérations du code génétique, qui entraînent la formation d'un codon stop prématuré au cours du processus de transcription, entraînant ainsi la synthèse d'une protéine incomplète, non fonctionnelle.

Les mutations non-sens sont présentes chez près de 13% de patients atteints de DMD.

La FDA a accordé au PTC124 le statut correspondant à une procédure accélérée de développement, d'évaluation et de commercialisation, et a accordé au médicament le statut de médicament orphelin pour le traitement de la mucoviscidose et de la DMD induites par une mutation non-sens. Le PTC124 a également reçu le statut de médicament orphelin de la part de la Commission européenne pour le traitement de la mucoviscidose et de la DMD.

L'administration du PTC124 ne nécessite pas le recours à un vecteur viral ou un matériel génétique étranger à l'organisme. Le PTC124 est présenté sous forme de poudre aromatisée à la vanille. La poudre peut être mélangée dans l'eau, ou du lait pour être consommée par le patient.

Thérapie **cellulaire**

Culture organotypique du cœur

Un nouveau modèle de cœur *in vitro* a été développé pour tester les thérapies du cœur. Il s'agit d'un intermédiaire entre le modèle de culture cellulaire en boîte et le modèle d'organe entier. Ce modèle organotypique a été élaboré à partir des tranches de ventricules (1 mm d'épaisseur) de cœur de rat (âgé de 3 jours) placées sur une plaque de culture cellulaire Millicell.

Les examens histologiques sont restés normaux pendant plusieurs mois. Les battements des tranches de ce cœur modèle se font de façon automatique sur un rythme régulier, quelques jours après leur mise en culture et pendant les trois mois de l'expérience. Leur fréquence est même accélérée par l'adrénaline. Des résultats similaires ont été obtenus avec des tranches de cœur humain, provenant d'embryons âgés de 8 semaines.

D'autre part, des cellules souches embryonnaires humaines (hES) implantées sur les tranches ventriculaires de rat ont survécu et se sont différenciées en cardiomyocytes. Le rythme cardiaque des tranches de cœur de rat est resté inchangé.

Ces résultats démontrent bien la validité du modèle organotypique. Il sert, non seulement de substrat pour la croissance et la différenciation cellulaire, mais aussi de modèle *in vitro* fonctionnel pour des analyses thérapeutiques expérimentales.

La mélatonine : un "booster" cellulaire

La mélatonine (connue pour son fort pouvoir antioxydant) ajoutée à des cultures de cellules souches mésenchymateuses a permis d'allonger leur durée de vie et d'améliorer la fonction cardiaque, lorsqu'elles sont transplantées dans le cœur de rats ayant eu un infarctus du myocarde.

Ces cellules souches adultes sont à l'origine des cellules du tissu osseux, cartilagineux et graisseux mais également du tissu musculaire squelettique ou cardiaque. Jusqu'à présent, elles meurent à plus de 80% à cause du stress oxydatif lorsqu'elles sont greffées dans le cœur ou dans le rein de modèles animaux.

Réparation cardiaque : du rat au singe

Dans la recherche pré-clinique sur la réparation du muscle cardiaque, un nouveau pas vient d'être franchi avec l'utilisation d'un modèle plus proche de l'homme : des singes présentant un infarctus du myocarde. Les résultats ont montré une différenciation des cellules embryonnaires en cardiomyocytes et l'absence de développement tumoral dans le cœur ou dans d'autres organes.

Muscles sphinctériens restaurés

La thérapie cellulaire vise à remplacer des populations de cellules déficientes afin de restaurer les fonctions du tissu endommagé suite à une maladie ou à un traumatisme.

Les premiers résultats des essais cliniques réalisés en pathologie sphinctérienne, notamment dans l'incontinence urinaire (suite à la chirurgie de la prostate par exemple), et l'incontinence anale (une complication possible des épisiotomies lors de l'accouchement) ont été présentés. Dans le traitement de l'incontinence urinaire, des cellules précurseurs du muscle ont été utilisées. La biopsie est réalisée au niveau du muscle deltoïde de l'avant-bras sous anesthésie locale. Dans l'incontinence anale, des sites d'injection précis et la surveillance de l'efficacité du traitement ont pu être visualisés. D'autres essais cliniques sont en prévision.



Association reconnue d'utilité publique
1, rue de l'Internationale - BP 59 - 91002 Evry cedex
Tél. : 01 69 47 28 28 - Fax : 01 60 77 12 16
Siège social : AFM - Institut de Myologie
47-83, boulevard de l'Hôpital 75651 Paris cedex 13
www.afm-france.org