

MARTIN LÉTOURNEAU

**L'utilisation de lymphocytes T régulateurs pour moduler
la réponse immunitaire envers les myoblastes greffés**

Mémoire présenté
à la Faculté des Études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en microbiologie-immunologie
pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2009

Résumé

La dystrophie musculaire de Duchenne est une maladie neuromusculaire affectant un garçon sur 3200. Cette maladie se caractérise par l'absence d'une simple protéine, la dystrophine, qui assure normalement l'intégrité des fibres musculaires. Sans cette protéine, les fibres musculaires sont plus facilement endommagées, provoquant une dégénérescence musculaire. Rapidement, les facultés locomotrices diminuent, confinant habituellement le patient à un fauteuil roulant vers l'âge de 10 ans. L'utilisation d'une assistance respiratoire s'avère généralement nécessaire au début de la vingtaine et le décès peut survenir dès l'âge de 17 ans. Les patients atteignent rarement la trentaine.

La thérapie cellulaire se situe parmi les traitements curatifs potentiels et consiste à implanter au patient dystrophique des myoblastes contenant le gène normal de la dystrophine. Évidemment, cette thérapie présente quelques inconvénients, dont une réaction immune du patient contre les myoblastes transplantés.

C'est ici qu'interviennent les travaux présentés dans ce mémoire avec comme objectif principal d'utiliser les lymphocytes T régulateurs (Tregs) afin de créer un protocole de tolérance non-toxique pour les patients dystrophiques. Jusqu'à maintenant, nous avons réussi à isoler efficacement et de manière reproductible ces Tregs en utilisant une armada d'anticorps spécifiques. Plus précisément, nous avons actuellement une pureté moyenne se situant entre 90% et 95%. Par après, en démontrant l'expression du FoxP3 au sein de ces cellules, ces travaux prouvent hors de tout doute que les cellules purifiées sont des Tregs au sens propre du terme. Finalement, par des essais *in vitro*, nous avons efficacement démontré que les Tregs isolés conservaient leur capacité immunorégulatrice. En effet, suite à une stimulation artificielle, les lymphocytes T CD4⁺ mis en co-culture avec un ratio de Tregs de 1:4 se divisent deux fois moins que ceux sans Tregs.

Afin de conclure ces travaux, il reste deux étapes majeures avant de crier victoire. Premièrement, il faut réussir à multiplier des Tregs spécifiques afin d'en avoir un nombre suffisant et d'avoir une plus grande spécificité. Deuxièmement, il faudra les réintroduire chez un modèle animal afin de tester s'ils empêchent le rejet d'une greffe allogénique.

Abstract

The Duchenne muscular dystrophy is a neuromuscular disorder affecting one boy over 3200. This pathology is characterized by the absence of a simple protein, the dystrophin, whose normal role is to maintain the muscle fiber integrity. Without this protein, the muscle fibers are easily injured, causing progressive muscle degeneration in dystrophic patient. Rapidly, locomotion abilities decrease, confining the patient to a wheelchair towards the age of 10 years. The use of respiratory assistance proves to be necessary at the early twenties and deceases may occur from the age of seventeen. The patients seldom attain about thirty.

Cellular therapy is among the potential curative treatments and consists to implant in the dystrophic patient muscles myoblasts containing the normal gene of dystrophin. Of course, this therapy presents some disadvantages of which an immune reaction of the patient against the transplanted myoblasts.

It is here that intervene the experiments presented in this memoire with as main objective to use regulatory T cells (Tregs) to create a non-toxic tolerance protocol for dystrophic patients. Till now, we were able to isolate in an efficient and reproducible manner these Tregs by using an armada of specific antibodies. More precisely, we currently have an average purity being between 90% and 95%. Afterwards, we demonstrated the expression of FoxP3 within these cells, this result showing without any doubt that the purified cells are really Tregs. Finally, by *in vitro* assays, we efficiently showed that these isolated Tregs kept their immunoregulatory function. As a matter of fact, after an artificial stimulation, CD4⁺ T-lymphocytes placed in co-culture at a ratio of 1:4 with Tregs divided two times less than those without Tregs.

To fulfill our initial aim, there are two additional major experiments remaining before claiming victory. First, it is necessary to multiply specific Tregs to have a sufficient number and to have a high specificity. Second, we have to reintroduce them in an animal model to test whether they can prevent an allogenic rejection.

Avant-propos

Être chercheur n'est pas une tâche facile car nous sommes plus souvent qu'autrement confrontés à une multitude de complications ou d'échecs. De plus, lorsque nous réussissons finalement à trouver une réponse à un problème que se pose la communauté scientifique, il faut être les premiers à la publier sinon la reconnaissance des autres ne nous est pas attribuée. C'est ainsi que ces courtes études graduées m'ont inculqué la patience et l'humilité.

J'aimerais évidemment remercier le Dr Jacques P. Tremblay qui m'a accueilli dans son laboratoire de manière exceptionnelle en me fournissant tous les outils possibles et inimaginables pour que je puisse surmonter, à mon tour, quelques obstacles d'ordre scientifique. De plus, il m'a introduit dans plusieurs grandes sphères scientifiques tel le réseau des cellules souches qui m'a été d'un apport plus que généreux en m'envoyant en formation un peu partout à travers le Canada.

J'aimerais également remercier tous mes collègues de laboratoire qui étaient toujours là pour m'aider, pour me conseiller ou tout simplement pour m'encourager. J'aimerais remercier spécifiquement le Dr Stéphan qui m'a introduit à l'immunologie, qui m'a guidé à travers mes expériences et qui est devenu avec le temps un très bon ami.

Il ne faut pas passer sous silence l'implication des membres de ma famille ainsi que mes amis qui ont sans cesse été là pour moi. Toujours prêts à me divertir avec une partie de pêche ou une soirée de festivités, ils ont su m'éloigner à plusieurs reprises de ce mémoire qui aurait probablement été terminé bien avant ... Néanmoins, ma copine Amélie était là pour me remettre dans le droit chemin en m'assignant à la résidence tout en me démontrant un exemple de rigueur et de volonté pour ses travaux d'études supérieures; merci Chérie, je t'aime de tout mon cœur !

*Comme il serait narcissique de dédier
ce mémoire à moi-même, je le dédis donc à
ma famille, à mes amis ainsi qu'à l'humanité!*

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| RÉSUMÉ | I |
| ABSTRACT..... | I |
| AVANT-PROPOS..... | II |
| TABLE DES MATIÈRES..... | IV |
| LISTE DES TABLEAUX..... | VII |
| LISTE DES FIGURES | VIII |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | IX |
| INTRODUCTION | 1 |
| CHAPITRE 1 : LE MUSCLE..... | 3 |
| 1.1 LES DIFFÉRENTS TYPES DE MUSCLES..... | 3 |
| 1.1.1 LE MUSCLE STRIÉ SQUELETTIQUE | 4 |
| 1.1.2 LE MUSCLE STRIÉ CARDIAQUE | 8 |
| 1.1.3 LE MUSCLE LISSE..... | 9 |
| 1.2 LA MYOGENÈSE DU MUSCLE STRIÉ SQUELETTIQUE | 10 |
| 1.3 LA RÉGÉNÉRATION MUSCULAIRE | 11 |
| 1.3.1 LA PHASE DÉGÉNÉRATIVE | 11 |
| 1.3.2 LA PHASE RÉGÉNÉRATIVE..... | 12 |
| CHAPITRE 2 : LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE | 13 |
| 2.1 HISTORIQUE DE LA DMD | 13 |
| 2.2 LA PATHOPHYSIOLOGIE DE LA DMD | 15 |
| 2.3 LA DYSTROPHINE | 17 |
| 2.3.1 LE GÈNE DE LA DYSTROPHINE..... | 17 |
| 2.3.2 LA PROTÉINE | 18 |
| 2.3.3 LE COMPLEXE ASSOCIÉ..... | 20 |
| 2.4 LES MODÈLES ANIMAUX DYSTROPHIQUES | 21 |
| 2.4.1 LA SOURIS MDX | 21 |
| 2.4.2 LE CHAT HFMD..... | 23 |
| 2.4.3 LE CHIEN GRMD | 23 |
| 2.5 LES PRINCIPALES THÉRAPIES NON-CELLULAIRES | 24 |
| 2.5.1 LA THÉRAPIE PHARMACOLOGIQUE | 25 |
| 2.5.2 LA THÉRAPIE GÉNIQUE | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 2.6 LA THÉRAPIE CELLULAIRE | 29 |
| 2.6.1 LA TRANSPLANTATION DE MYOBLASTES NORMAUX | 30 |
| 2.6.2 LA TRANSPLANTATION DE MYOBLASTES MODIFIÉS GÉNÉTIQUEMENT | 31 |
| 2.6.3 LA TRANSPLANTATION DE MYOBLASTES DÉRIVÉS DE CELLULES SOUCHES | 32 |
| 2.6.4 LES BARRIÈRES À LA THÉRAPIE CELLULAIRE | 32 |
| 2.7 LES AUTRES TYPES DE DYSTROPHIES MUSCULAIRES | 34 |
| 2.7.1 LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE BECKER..... | 36 |
| 2.7.2 LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE D'EMERY-DREIFUSS | 36 |
| 2.7.3 LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE FACIO-SCAPULO-HUMÉRALE | 37 |
| 2.7.4 LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE OCULO-PHARYNGÉE | 37 |
| 2.7.5 LES DYSTROPHIES DISTALES | 38 |
| 2.7.6 LES DYSTROPHIES MUSCULAIRES CONGÉNITALES..... | 38 |
| 2.7.7 LES DYSTROPHIES MUSCULAIRES MYOTONIQUES..... | 39 |
| 2.7.8 LES DYSTROPHIES MUSCULAIRES DES CEINTURES..... | 40 |
| CHAPITRE 3 : TRANSPLANTATION ET TOLÉRANCE | 41 |
| 3.1 LES TYPES DE TRANSPLANTATION | 42 |
| 3.1.1 L'AUTOGREFFE | 42 |
| 3.1.2 L'ISOGREFFE | 42 |
| 3.1.3 L'ALLOGREFFE | 42 |
| 3.1.4 LA XÉNOGREFFE | 43 |
| 3.2 LE REJET DE GREFFE | 43 |
| 3.2.1 LE REJET HYPER-AIGU | 43 |
| 3.2.2 LE REJET AIGU | 44 |
| 3.2.3 LE REJET CHRONIQUE | 44 |
| 3.3 LE GVHD | 44 |
| 3.4 L'IMMUNOSUPPRESSION..... | 45 |
| 3.4.1 LES GLUCOCORTICOÏDES | 45 |
| 3.4.2 LES CYTOSTATIQUES | 46 |
| 3.4.3 LES ANTICORPS..... | 46 |
| 3.4.4 LES INHIBITEURS DE LA CALCINEURINE | 47 |
| 3.4.5 AUTRES MÉTHODES IMMUNOSUPPRESSIVES..... | 48 |
| 3.5 LA TOLÉRANCE IMMUNOLOGIQUE..... | 48 |
| 3.5.1 LA TOLÉRANCE CENTRALE | 49 |
| 3.5.2 LA TOLÉRANCE PÉRIPHÉRIQUE | 52 |

| | |
|---|-----------|
| CHAPITRE 4 : L'UTILISATION DES LYMPHOCYTES T RÉGULATEURS | 57 |
| 4.1 PROBLÉMATIQUE..... | 57 |
| 4.2 INTRODUCTION | 58 |
| 4.3 MATÉRIEL ET MÉTHODES | 58 |
| 4.3.1 L'ISOLATION DES TREGS | 58 |
| 4.3.2 LA CARACTÉRISATION DES TREGS | 59 |
| 4.3.3 LE POTENTIEL D'INHIBITION DES TREGS | 61 |
| 4.4 RÉSULTATS | 63 |
| 4.4.1 L'ISOLATION DES TREGS | 63 |
| 4.4.2 LA CARACTÉRISATION DES TREGS | 65 |
| 4.4.3 LE POTENTIEL D'INHIBITION DES TREGS | 66 |
| 4.5 DISCUSSION..... | 70 |
| 4.6 CONCLUSION | 73 |
| CONCLUSION GÉNÉRALE..... | 74 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 76 |
| ANNEXE 1 – <i>CD4⁺CD25⁺ REGULATORY T CELL ISOLATION KIT</i>..... | 98 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 2-1: Les différentes isoformes de la dystrophine | 18 |
| Tableau 2-2: Survol de différents types de souris MDX | 22 |
| Tableau 2-3: Classement des dystrophies | 35 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1-1: Le système musculaire humain | 4 |
| Figure 1-2: Le muscle strié squelettique..... | 5 |
| Figure 1-3: La fibre musculaire en détails | 6 |
| Figure 1-4: Le muscle strié cardiaque..... | 8 |
| Figure 2-1: Guillaume Duchenne effectuant une stimulation électrique | 14 |
| Figure 2-2: Manœuvre de Gowers | 15 |
| Figure 2-3: Joseph Sarrazin, premier patient de Guillaume Duchenne | 16 |
| Figure 2-4: Représentation moléculaire de la dystrophine | 19 |
| Figure 2-5: Le complexe glycoprotéique associé à la dystrophine..... | 20 |
| Figure 2-6: Un chien sans myostatine..... | 26 |
| Figure 2-7: Schématisation de la thérapie cellulaire..... | 30 |
| Figure 2-8: Problèmes majeurs liés à la thérapie cellulaire | 33 |
| Figure 3-1: Fresque de Fra Angelico représentant la greffe d'une jambe au 3 ^e siècle..... | 41 |
| Figure 3-2: Rein infarci..... | 43 |
| Figure 3-3: Résultats de greffes chez une souris MDX suite au TTCB | 51 |
| Figure 3-4: L'induction de Tregs..... | 54 |
| Figure 4-1: Marquage au CFSE | 61 |
| Figure 4-2: Évolution du marquage CD4/CD25 lors de la sélection par MACS | 64 |
| Figure 4-3: Immunobuvardage contre le FoxP3 | 65 |
| Figure 4-4: Patron de diffusion du CFSE dans les 24 premières heures | 66 |
| Figure 4-5: Inhibition de la prolifération cellulaire par les Tregs..... | 68 |
| Figure 4-6: Schématisation de l'indice de prolifération dans le temps | 69 |

Liste des abréviations

| | |
|--|---|
| AA : acides aminés | DM : dystrophie myotonique |
| AAV : adeno-associated virus | DMD : dystrophie musculaire de Duchenne |
| AICD : <i>activation-induced cell death</i> | DMPK : <i>dystrophy myotonic protein kinase</i> |
| AONs : <i>anti-sens oligonucleotides</i> | dnActRIIB : <i>dominant-negative activin receptor IIB</i> |
| ARN : acide ribonucléique | EDMD : Emery-Dreifuss muscular dystrophy |
| ATGAM® : <i>anti-thymocyte gamma globulin</i> | FACS : <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> |
| ATP : adénosine triphosphate | FDA : <i>food and drug administration</i> (É-U) |
| BCR : <i>B-cell receptor</i> | FGF : <i>fibroblast growth factor</i> |
| bFGF : <i>basic fibroblast growth factor</i> | FKBP52 : <i>FK506 binding protein 52</i> |
| Bcl-2 : <i>B-cell lymphoma 2</i> | FLRP : <i>follistatine related proteins</i> |
| Bcl-xl : <i>basal cell lymphoma-extra large</i> | FoxP3 : <i>forkhead box P3</i> |
| BMD : <i>Becker muscular dystrophy</i> | FSHD : <i>facioscapulohumeral muscular dystrophy</i> |
| BMT : <i>bone marrow transplantation</i> | FKRP : <i>fukutin-related protein</i> |
| CAA : cyanide–adénine–adénine (codon glutamine) | GR : <i>glucocorticoid receptor</i> |
| CD : <i>cluster of differentiation</i> | Grb2 : <i>growth factor receptor-bound protein 2</i> |
| CDR : <i>complementarity determining region</i> | GRMD : <i>golden retriever muscular dystrophy</i> |
| CFSE : <i>carboxy fluorescein succinimidyl ester</i> | GVHD : <i>graft versus host disease</i> |
| CLCN : <i>chloride channel 1</i> | HBSS : <i>Hank's balanced salt solution</i> |
| CMD : <i>congenital muscular dystrophy</i> | HFMD : <i>hypertrophic feline muscular dystrophy</i> |
| CMH : complexe majeur d'histocompatibilité | HIBM : <i>hereditary inclusion body myopathy</i> |
| CMV : cytomégalovirus | HSC : <i>hematopoietic stem cell</i> |
| CPA : cellule présentatrice d'antigènes | IDO : indoléamine 2,3-dioxygénase |
| DC : <i>dendritic cell</i> | Ig : immunoglobuline |

IGF-1 : *insulin growth factor type 1*

IL-4 : interleukine de type 4

IMPDH: ionosine monophosphate déshydrogénase

INF- γ : interféron- γ

kb : kilobase

kDa : kiloDalton

LARGE: *acetylglucosaminyltransferase-like protein*

LB: lymphocyte B

LGMD : *limb girdle muscular dystrophy*

LT : lymphocyte T

MACS : *magnetic affinity cell sorting*

MAST : *microtubule associated serine/threonine*

Mb : mégabase

MDC1A : *merosin-deficient CMD type 1A*

MDX : *muscular dystrophy X-linked*

MEBD : *muscle-eye-brain disease*

MLR : *mixed lymphocytes reaction*

MMF : mycophénolate mofetil

MTM1 : *myotubularin-related protein 1*

Myf5 : *myogenic factor 5*

MyHC : *myosin heavy chain*

nm : nanomètre

NK: *natural killer*

NOS : *nitric oxide synthase*

OPMD : *oculopharyngeal muscular dystrophy*

PABPN1 : *poly(A) binding protein nuclear 1*

Pax7: *paired box gene 7*

PCK : phosphocréatine kinase

PE : phycoérythrine

PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate

POMT1 : *protein O-mannosyltransferase-1*

POMT2 : *protein O-mannosyltransferase-2*

PP2B: *protein phosphatase 2B*

RSMD1: *rigid spine muscular dystrophy 1*

SNC : système nerveux central

snRNA : *small nuclear ribonucleic acid*

TAA : thymine–adénine–adénine (codon stop)

TCR : *T-cell receptor*

TGF- β : *transforming growth factor- β*

T_H : *helper CD4⁺ T-cell*

TNF- α : *tumor necrosis factor- α*

Treg : *T-regulatory cell*

TRIM32 : *tripartite motif-containing protein-32*

TTB : Tregs, tréosulfan, BMT

TTCB : transfusion, tréosulfan, cyclophos., BMT

ZNF : *zinc finger protein*

Introduction

Le corps humain peut être considéré comme étant une machine comportant une foule de composantes et de systèmes interagissant les uns avec les autres. Parfois, en n'enlevant qu'une seule pièce, cette machine peut se dérégler complètement, entraînant du coup une fin tragique. En ce qui concerne la dystrophie musculaire de Duchenne, elle est causée par l'absence d'une simple pièce, en l'occurrence une protéine : la dystrophine. Cette dernière est essentielle au niveau de l'intégrité des fibres musculaires et une dégénérescence musculaire est inévitable sans elle. De nos jours, il n'y a aucun traitement curatif à cette pathologie et les effets des quelques drogues palliatives sont très mitigés. Actuellement, plusieurs équipes travaillent d'arrache-pied afin de trouver une solution à ce problème d'envergure. Le laboratoire du Dr Tremblay, quant à lui, tente de mettre au point une thérapie cellulaire basée sur la transplantation de myoblastes contenant le gène normal de la dystrophine. Ce mémoire se veut donc une brève revue de la situation actuelle de la DMD tout en se concentrant sur les problèmes immunologiques liés à cette thérapie.

Tout d'abord, étant donné que la DMD est une maladie affectant principalement les muscles, le premier chapitre y sera consacré entièrement. Les principales caractéristiques des différentes sous-catégories musculaires : le muscle strié cardiaque, le muscle strié squelettique ainsi que le muscle lisse y seront présentées. Par après, une emphase au niveau du muscle strié squelettique sera présentée en abordant tout d'abord son embryogenèse, pour ensuite étudier les processus de dégénérescence/régénérescence musculaire auxquels sont constamment soumis les patients dystrophiques.

Par la suite, les aspects historiques et actuels de la DMD seront traités au second chapitre. L'historique de sa découverte sera présenté avant de se concentrer sur la dystrophine : sa structure, son rôle ainsi que les conséquences de son absence. Les principaux modèles animaux ainsi que les diverses avenues thérapeutiques actuelles suivront, tout en traitant de manière plus profonde la thérapie cellulaire. Ce chapitre se terminera par un survol de tous les autres types de dystrophie actuellement connus afin de mieux visualiser toutes les dystrophies ayant le potentiel d'être guéries par la thérapie cellulaire.

Le troisième chapitre traitera quant à lui de la transplantation et de la tolérance immune, la solution à l'une des trois principales barrières à la thérapie cellulaire. Plus précisément, les différents types de transplantations et les problèmes s'y rattachant directement seront tout d'abord abordés. Parmi les sous-chapitres, un est entièrement consacré aux divers immunosuppresseurs couramment utilisés tout en démontrant leurs divers effets toxiques. Un autre point important de cette section est la tolérance immune, particulièrement à la tolérance périphérique, et un sous-chapitre y sera également dédié. Les lymphocytes T régulateurs, avec toutes leurs utilités thérapeutiques potentielles, occuperont donc une place prépondérante dans cette section.

Finalement, le quatrième chapitre traitera de l'évolution des travaux en ce qui concerne l'utilisation des lymphocytes T régulateurs dans le but de diminuer la toxicité des protocoles actuels de tolérance centrale. Nous passerons à travers tout le protocole théorique avant de faire le point sur l'avancement des travaux et des perspectives à moyen et long terme.

Chapitre 1 : Le muscle

L'étymologie du mot muscle remonte à l'époque romaine où les gens, voyant les muscles se contracter et se relâcher à plusieurs reprises, s'imaginaient une foule de petites souris qui se déplaçaient sous la peau. C'est ainsi qu'ils ont nommé ces organes contractiles *musculus*, qui veut dire littéralement souris en latin vulgaire. De fil en aiguille, le mot *musculus* s'est déformé pour devenir aujourd'hui le mot muscle dans la langue de Molière.

Du bout de nos orteils jusqu'au bout de nos doigts, immédiatement sous notre peau ou alentour de nos entrailles, le corps humain est constitué d'une multitude de muscles (Figure 1-1). Approximativement 639 muscles composent le corps humain, ce qui correspond généralement à 40% du poids sec d'un être humain. Bien qu'ils soient presque tous différents du point de vue de leur grosseur, de leur position et de leurs fonctions, la majorité de ces derniers sert essentiellement au mouvement du corps. Cependant, le maintien de la posture, la stabilisation des articulations et le dégagement de chaleur sont d'autres fonctions non-négligeables [5].

1.1 Les différents types de muscles

Chez l'homme, il existe trois types de muscles bien définis ayant chacun des propriétés et des fonctions bien spécifiques. Tout d'abord, il y a le muscle strié squelettique qui s'encre via les tendons au squelette et qui est contrôlé volontairement. Ensuite vient le muscle strié cardiaque, qui ressemble beaucoup au muscle strié squelettique, mais qui est de type involontaire. Finalement, il y a le muscle lisse, qui se situe au niveau de nos viscères et qui est également de type involontaire.

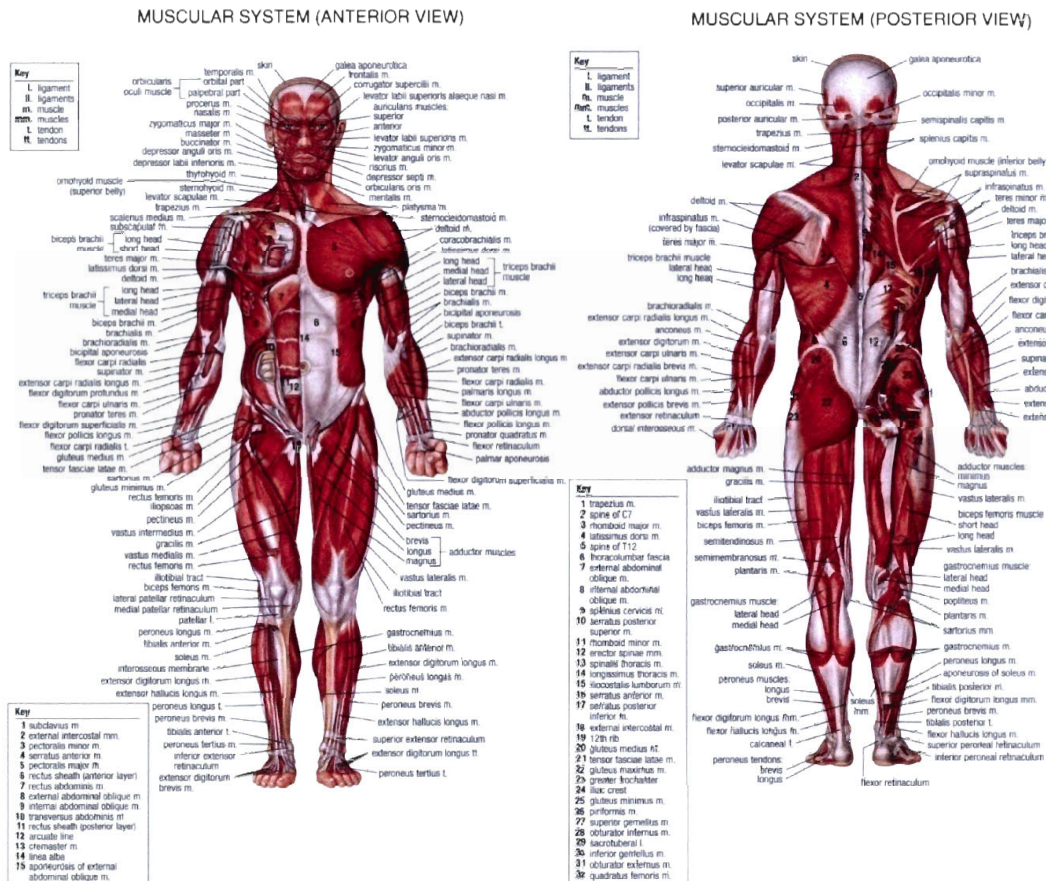


Figure 1-1: Le système musculaire humain

L'être humain est composé d'environ 639 muscles servant principalement au mouvement du corps. Parmi les autres fonctions des muscles, on compte le maintien de la posture, la stabilisation des articulations et le dégagement de chaleur. Figure adaptée de Stedman 2005 [8].

1.1.1 Le muscle strié squelettique

Le muscle strié squelettique compose la majorité des muscles du corps humain. Ce tissu musculaire recouvre notre squelette osseux en s'y attachant via les tendons pour y exercer des forces de traction. Que ce soit pour marcher, écrire ou se gratter, que ce soit le résultat d'une action volontaire ou non, la grande majorité des mouvements que nous accomplissons d'une manière quotidienne sont une résultante de la contraction des muscles squelettiques striés.

1.1.1.1 La structure du muscle strié squelettique

La structure du muscle strié squelettique est comparable à celle d'un élastique de type *bungee*. Cet élastique est tout simplement composé d'une foule de petits élastiques qui sont regroupés en groupe d'une taille intermédiaire. Par après, chacun de ces groupes est regroupé à nouveau pour former un élastique encore plus gros et ainsi de suite. Chaque sous-unité est isolée sur toute sa longueur par du tissu conjonctif fibreux avant de former à son tour le niveau supérieur d'organisation (Figure 1-2).

L'unité de base du muscle squelettique est la fibre musculaire, qui est en soi une seule cellule multinucléée. Ces fibres peuvent mesurer jusqu'à 30 cm de long avec un diamètre oscillant entre 10 et 100 μm . Chacune de ces fibres est isolée par une couche de tissu conjonctif fibreux que l'on appelle l'endomysium. Ensuite, plusieurs fibres sont regroupées en un faisceau qui lui est isolé à son tour par un autre type de tissu conjonctif que l'on nomme périmysium. Enfin, les faisceaux sont regroupés ensemble pour former le muscle qui lui est entouré à son tour par l'épimysium. Finalement, il y a une dernière structure, que l'on nomme le fascia profond, qui vient englober le muscle et qui le différencie en groupe fonctionnel. Le fascia profond sert également de support pour les systèmes nerveux, lymphatique et circulatoire.

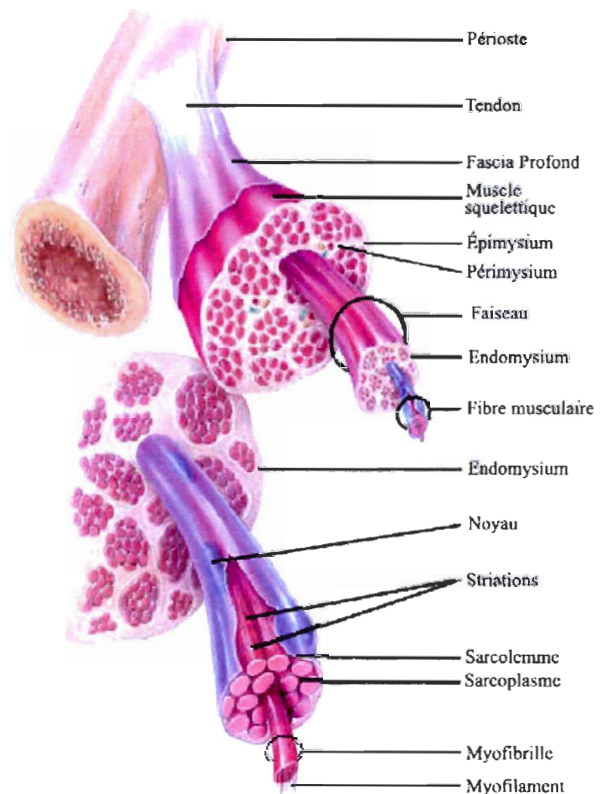


Figure 1-2: Le muscle strié squelettique

Chaque sous-unité du muscle strié squelettique est isolée par du tissu conjonctif avant d'être regroupée et incorporée au niveau supérieur. Figure adaptée de Tortora 1994 [6].

Pour ce qui est de la structure de la fibre musculaire, son organisation est aussi bien segmentée que les niveaux précédents. Tout d'abord, en plus de l'endomysium qui isole grossièrement les fibres musculaires, chacune d'entre-elles est entourée d'une membrane appelée sarcolemme, l'équivalent de la membrane plasmique. L'intérieur de la fibre est principalement composé par des myofibrilles alignées parallèlement et qui constituent en soi l'élément contractile du muscle. Le sarcoplasme, vient combler les interstices entre les myofibrilles et exerce un rôle équivalent à celui du cytoplasme. De plus, il contient d'importantes réserves de glycogène ainsi que de la myoglobine, un transporteur d'oxygène, qui sont tous deux essentiels lors des dépenses énergétiques.

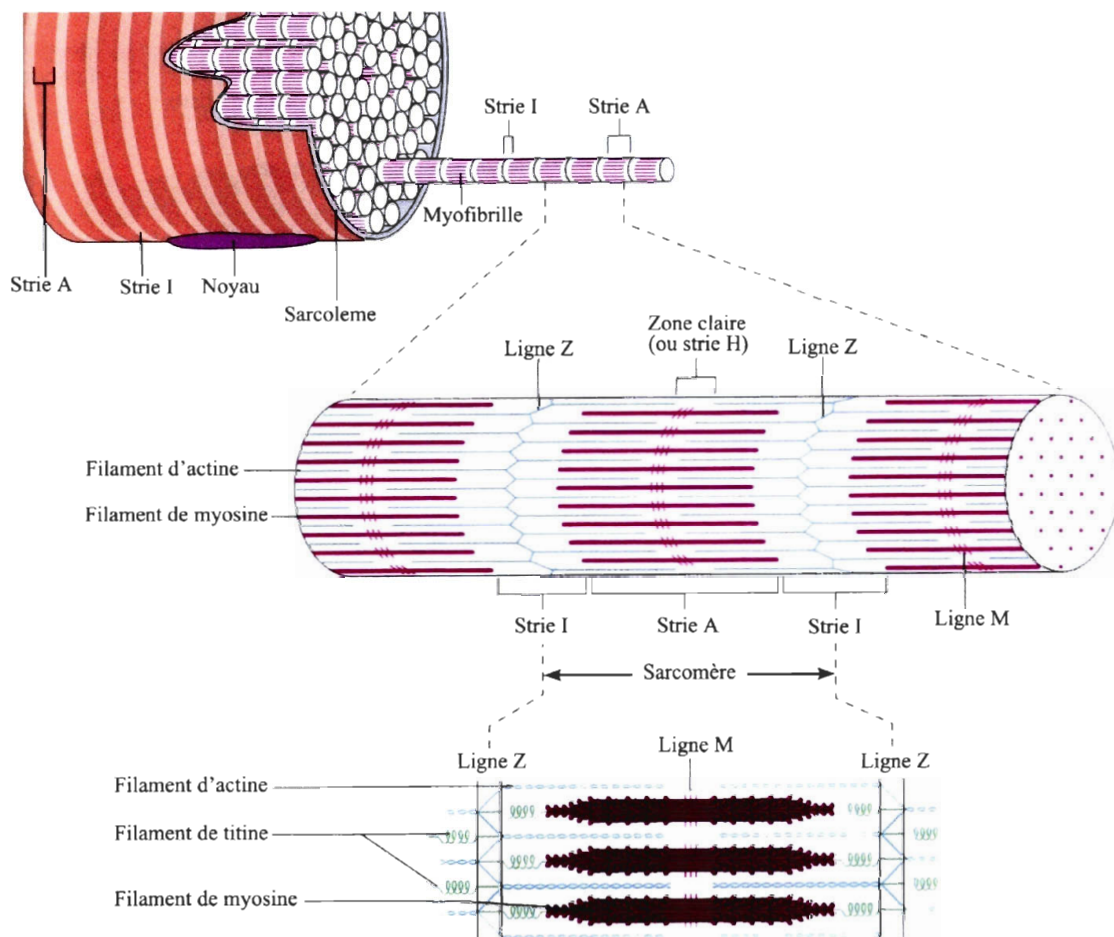


Figure 1-3: La fibre musculaire en détails

La fibre musculaire est caractérisée par une structure hautement répétitive : des filaments épais, la myosine, chevauchant partiellement des filaments minces, l'actine, le tout étant retenu par des filaments élastiques, la titine. Image adaptée de Marieb *et al.* 1999 [5].

En ce qui concerne la myofibrille, elle mesure de 1 à 2 μm de diamètre et c'est sa structure interne qui donne l'apparence striée au muscle squelettique (Figure 1-3). Plus précisément, c'est le chevauchement successif de deux myofilaments, la myosine et l'actine, qui provoque cette apparence. La myosine est plus épaisse que l'actine, ce qui produit les bandes foncées sur la myofibrille que l'on appelle strie A. Les régions comportant uniquement de l'actine, donc d'apparence plus claires, se nomment strie I. Comme l'actine et la myosine se chevauchent partiellement, les régions de la myosine qui ne se superposent pas à l'actine sont d'apparence légèrement plus pâle et se nomment strie H ou zone claire. Finalement, la ligne M peut être observée au centre des filaments de myosine, tout comme la ligne Z au centre des filaments d'actine.

1.1.1.2 La contraction du muscle strié squelettique

Une fois la structure de la myofibrille en tête, le principe de contraction d'un muscle est relativement facile à comprendre. Les filaments d'actine ne font que glisser encore plus le long des filaments de myosine, ce qui ne fait qu'augmenter le chevauchement de ces derniers. Au niveau des stries, la strie A reste de la même longueur, tandis que les stries H et I diminuent. Pour ce qui est du principe moléculaire de la contraction, la traction qu'exerce la myosine sur l'actine est explicable en quatre étapes. Premièrement, la myosine comporte plusieurs petites têtes (Figure 1-3d) qui lorsque qu'activées sont fortement attirées vers l'actine. Deuxièmement, une fois liée à l'actine, la tête de myosine se replie sur elle-même pour retrouver un état de conformation plus stable ; elle passe de la configuration de haute énergie à celle de basse énergie. Troisièmement, les têtes de myosine en configuration de basse énergie se détachent de l'actine lorsqu'une nouvelle molécule d'adénosine triphosphate (ATP) s'y lie. Quatrièmement, l'hydrolyse de l'ATP permet à la myosine de retourner dans sa configuration de haute énergie. Il est important de garder en mémoire que ce changement de conformation n'est pas synchronisé, c'est-à-dire que les têtes de myosine ne tirent pas toutes en même temps sur l'actine comme le ferait un groupe de rameur. De plus, la même tête de myosine peut tirer plusieurs fois sur l'actine lors de la même contraction car ces réactions se font extrêmement rapidement.

1.1.2 Le muscle strié cardiaque

Tout comme sa dénomination le laisse deviner, le muscle strié cardiaque compose le muscle qu'est le cœur. À l'instar du muscle strié squelettique, son apparence macroscopique au niveau des fibres musculaires recèle plusieurs stries dues aux filaments d'actine et de myosine qui se chevauchent de manière répétitive. Cependant, la similitude au niveau de l'apparence entre les deux muscles striés s'arrête ici.

1.1.2.1 La structure du muscle strié cardiaque

Tandis que le muscle strié squelettique présente des fibres effilées, cylindriques et multinucléées, les fibres du muscle strié cardiaque sont plutôt d'apparence trapue. Leur diamètre maximal est le même que les fibres striées squelettiques, soit 100 μm , mais leur longueur ne dépassent guère les 15 mm, comparativement à 30 cm pour leurs homologues squelettiques. Aussi, ces fibres semblent toutes

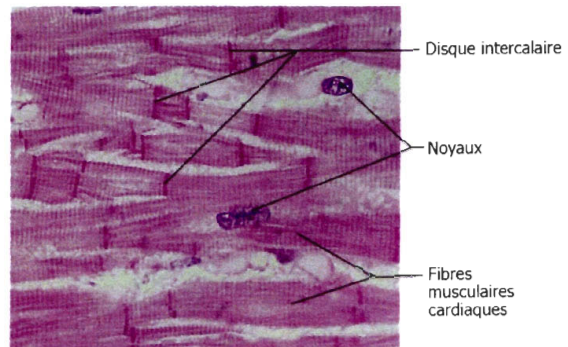


Figure 1-4: Le muscle strié cardiaque

Le muscle strié cardiaque présente une structure plus dense et d'apparence moins organisée que son homologue squelettique. Image adaptée de Marieb *et al.* 1999 [5].

s'entrelacer les unes avec les autres avec de nombreuses ramifications (Figure 1-4). En fait, en suivant le patron de ramification, on s'aperçoit que l'on peut diviser le cœur en deux réseaux distincts, où chacune des cellules composant chaque réseau sont anastomosées, c'est-à-dire qu'elles communiquent entre-elles. Le premier réseau est celui des oreillettes et compose la partie supérieure du cœur. Le second, quant à lui, compose la partie inférieure du cœur et regroupe les deux ventricules. De plus, les jonctions entre les cellules musculaires du cœur, les cardiomyocytes, présentent des disques intercalaires qui ont pour principale rôle d'assurer une transmission directe des influx nerveux. Il n'y a qu'un seul noyau à l'intérieur de chacune des fibres, comparativement au muscle strié squelettique qui peut compter plusieurs milliers de noyaux dans une seule fibre.

1.1.2.2 La contraction du muscle strié cardiaque

Le même principe physique de glissement entre l'actine et la myosine régit le muscle strié cardiaque. Cependant, la régulation de la contraction ainsi que la transmission de l'influx nerveux au niveau du cœur sont beaucoup plus complexes. Il existe même certaines cellules cardiaques qui ont le potentiel de s'exciter elles-mêmes et qui sont à la base du principe d'automatisme cardiaque. Aussi, l'onde de dépolarisation créant la contraction des cardiomyocytes est beaucoup plus dirigée que celle du muscle strié squelettique. En effet, il y a certains centres de contrôle sur cette voie servant à moduler la vitesse de propagation pour faire en sorte que la pompe qu'est le cœur fonctionne à merveille.

1.1.3 Le muscle lisse

Outre le cœur, la plupart de nos organes internes qui ont besoin de se contracter le font grâce à des muscles lisses. Parmi ces organes, on retrouve les artères, l'utérus, les intestins, la vessie et les organes des voies respiratoires.

1.1.3.1 La structure du muscle lisse

Les fibres musculaires lisses sont d'apparence fusiforme et elles sont généralement composées d'un seul noyau. Présentant une longueur variant entre 100 et 500 μm ainsi qu'un diamètre se situant entre trois et six micromètres, ces fibres sont beaucoup plus petites que leurs homologues striés. Au niveau de l'apparence macroscopique, il n'y a pas de sarcomères visibles comme dans les fibres striées ; elles sont plutôt agencées en biais. Généralement, ce type de muscle est disposé en deux couches : une dans le sens de l'organe et une autre perpendiculaire permettant ainsi d'agir sur la disposition de l'organe. Le muscle lisse se subdivise en deux sous-types : les muscles lisses unitaires, aussi appelé muscles viscéraux, et les muscles lisses multi-unitaires. Les muscles lisses unitaires sont disposés en réseau avec un système de communication de type jonction ouverte reliant chacune des cellules et permettant à ces dernières de battre de manière synchrone. Les muscles lisses multi-unitaires, quant à eux, sont composés de fibres musculaires indépendantes, sont en moins grand nombre et se retrouvent à la base des poils, à l'intérieur de l'œil ainsi qu'au niveau des grandes artères et des voies respiratoires.

1.1.3.2 La contraction du muscle lisse

La contraction du muscle lisse est de type involontaire. Ainsi, un influx nerveux du système autonome, certaines hormones ou tout simplement des facteurs locaux peuvent provoquer la contraction de ces derniers. Au niveau de la contraction, elle est généralement plus lente qu'au niveau des fibres striées.

1.2 La myogenèse du muscle strié squelettique

Au niveau du développement embryonnaire, les muscles striés squelettiques proviennent des somites du mésoderme para-axial. Plusieurs facteurs distinctifs viennent jouer lors de la détermination du myotome via des sécrétions et des gradients de plusieurs facteurs de transcription. Parmi les plus importants, on compte la sécrétion de Wnt1 et Wnt3a par la partie dorsale du tube neural et la basse sécrétion de *Sonic hedgehog* (Shh) par sa partie ventrale en agencement avec la sécrétion par la lame latérale de BMP4 et de FGF5 [13-15]. Une fois ces molécules secrétées, les cellules du myotome vont produire Pax3 ou Myf5, dépendamment si ces cellules sont situées au niveau de l'hypomère, à l'origine des muscles des flancs et des membres, ou si ces cellules sont situées au niveau de l'épimère, à l'origine des muscles dorsaux [16, 17]. Une fois Pax3 ou Myf5 produit, ils vont activer le gène MyoD qui caractérise les cellules musculaires : les myoblastes. En présence de facteurs de croissance comme le FGF, les myoblastes se divisent sans cesse par mitose. Aussitôt que certains de ces facteurs viennent à manquer, les myoblastes cessent de se diviser et secrètent de la fibronectine au niveau de la matrice extracellulaire et y adhèrent via leur $\alpha_5\beta_1$ intégrines [18, 19]. Ensuite, les myoblastes s'alignent les uns à la suite des autres à l'aide de plusieurs cadhérines et fusionnent grâce à certaines métalloprotéinases pour former des myotubes et l'apparition de vaisseaux sanguins complète leur maturation en fibre musculaires. Il est à noter que ce n'est pas toutes les cellules du myotome qui vont se différencier en myoblastes; une sous-population, appelée cellule satellite, va rester quiescente au niveau de la lame basale du muscle et interviendra éventuellement au niveau de la régénérescence musculaire.

1.3 La régénération musculaire

Lorsque nous sollicitons trop fortement nos muscles, des fibres musculaires sont endommagées et nécessitent une réparation immédiate afin d'accomplir efficacement leurs divers rôles. Même pour des bris de grandes amplitudes, les muscles squelettiques striés sont capables de se régénérer d'eux-mêmes. Aussitôt le dommage fait à la cellule, le mécanisme de régénération des fibres musculaires se met en branle et se compose de deux étapes bien distinctes : la phase dégénérative et la phase régénérative [20, 21].

1.3.1 La phase dégénérative

Aussitôt qu'une fibre musculaire est endommagée, l'intégrité de la membrane cellulaire est compromise et une perméabilité est ainsi créée. Dans un premier temps, cette brèche entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire cause la perte du gradient de calcium intracellulaire. Cette entrée massive de calcium au niveau de la cellule provoque ainsi l'activation de la calpaïne [22, 23], qui à son tour engendre une réorganisation du cytosquelette [24]. Aussi, la calpaïne, via certaines activités protéolytiques, aggravera la dégénérescence musculaire [22, 25]. Dans un deuxième temps, la perméabilité de la membrane de la fibre musculaire permet la libération de phosphocréatine kinase (PCK). Une fois dans le milieu extracellulaire, la PCK sérique peut servir d'indicateur du taux de bris musculaire systémique et ainsi être utilisée comme agent corrélateur de certaines maladies dégénératives musculaires telles les dystrophies [26-28]. Finalement, la phase dégénérative est caractérisée par l'arrivée de cellules du système immunitaire. Tout d'abord, les macrophages résidents sont activés et secrètent des molécules pro inflammatoires qui attireront à leur tour une série d'autres cellules du système immunitaire comme les neutrophiles [29, 30]. Ces cellules ont comme rôle principal de phagocyter les débris cellulaires et pourraient également participer à l'activation des cellules satellites nécessaires pour la réparation du muscle [31, 32].

1.3.2 La phase régénérative

Une fois que les cellules endommagées ont commencé à être nettoyées par le système immunitaire, le tissu musculaire commence à se réparer via certains signaux émis par les cellules du système immun. La première étape de cette phase consiste à sortir les cellules satellites de leur latence au niveau du site nécessitant réparation pour qu'elles commencent à se multiplier activement. Cette étape est très similaire à celle rencontrée lors de la myogenèse. Suite à leur prolifération, les cellules se différencieront en myocytes avant de fusionner entre elles ou avec des myotubes déjà présents au site du bris [20]. Une fois cette étape terminée, la fibre regagne graduellement sa grosseur et retrouve sa fonctionnalité.

Chapitre 2 : La dystrophie musculaire de Duchenne

Comme n'importe quelle partie du corps humain, les muscles peuvent être affectés par une multitude de troubles ou d'affections appelés myopathies. D'ordre génétique à transmission dominante ou récessive, en passant par les myopathies acquises, un simple dérèglement musculaire peut avoir d'importantes répercussions au niveau physiologique. Un des sous-ensembles des myopathies est appelé dystrophie musculaire et regroupe une foule de maladies distinctes, mais toutes caractérisées par une faiblesse ainsi qu'une dégénération progressive du tissu musculaire squelettique [33]. Avec une prévalence de 1:3200 chez les garçons, la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la myopathie infantile la plus répandue.

2.1 Historique de la DMD

Attribuer le mérite des premières observations décrivant des signes cliniques associés aujourd'hui à la DMD est une chose complexe. Le nombre de chercheurs en cause est très grand et les dates auxquelles ces observations ont été faites se chevauchent partiellement. Tout d'abord, en 1836, deux chercheurs italiens, G. Conte et son assistant L. Gioja, ont écrit un article portant sur deux frères présentant une faiblesse progressive des jambes ainsi que des signes d'hypertrophie musculaire [34]. Dans cette étude, les auteurs citent les travaux d'un médecin italien, Giovanni Semmola, qui aurait décrit brièvement ces mêmes frères en 1829 et qui serait donc le premier à avoir présenté officiellement des travaux scientifiques sur cette pathologie. Malheureusement, cette citation est la seule trace à ce jour de cet article qui demeure autrement introuvable [9]. S'il existait, ce rapport devancerait d'un an celui de Sir Charles Bell, qui a décrit en 1830 un autre cas clinique associable à la DMD dans un de ses ouvrages sur le système nerveux humain [35]. Cependant, selon le professeur Alan Emery, autant les études de Semmola, de Bell ou de Conte ne sont pas assez exhaustives pour que leurs auteurs soient considérés comme père de la DMD [36]. La première véritable étude aurait été publiée en 1851 par un médecin anglais du nom d'Edward Meryon [37]. Dans cette étude, Meryon en est venu à la conclusion que la faiblesse musculaire progressive était corrélée à d'une destruction du tissu musculaire au niveau sarcolemmique, ce qui est aujourd'hui une caractéristique importante de la DMD.

Approximativement dans les mêmes années que Meryon publiait son article sur la dégénération des muscles volontaires, un neurologue français appelé Guillaume-Benjamin-Amand Duchenne de Boulogne-sur-Mer (Figure 2-1), considéré par certains comme étant le fondateur de la neurologie, s'intéresse au même sujet. Ses publications sur cette pathologie arrivent toutefois près d'une décennie après la première publication de Meryon, soit en 1861 [38]. Cependant, tandis que Meryon croit que l'origine de cette pathologie est nutritionnelle, pour ensuite suspecter une origine au niveau de la moelle épinière, Duchenne croit plutôt que l'origine de cette pathologie est cérébrale et lui donne le nom de « paraplégie hypertrophique de l'enfance » [9]. En 1868, suite à des études histologiques plus poussées, Duchenne se ravise et conclut plutôt à une origine musculaire [39]. Ensuite, il a décrit la fibrose ainsi que l'adipose caractérisant la DMD et il commence aussitôt à chercher différentes approches thérapeutiques tels les massages, l'hydrothérapie ainsi que les stimulations électriques [40]. Une des principales raisons pourquoi cette maladie ne s'appelle pas la dystrophie musculaire de Meryon, c'est que l'on retrouve à l'intérieur des diverses publications de Duchenne une revue de littérature très exhaustive relevant en détail les moindres différences entre la pathologie qu'il décrit et celle de Meryon; il disait que Meryon décrivait une simple atrophie musculaire et non une maladie [9, 39]. De plus, les études cliniques de Duchenne étaient beaucoup plus poussées au niveau étiologique que les autres de l'époque.

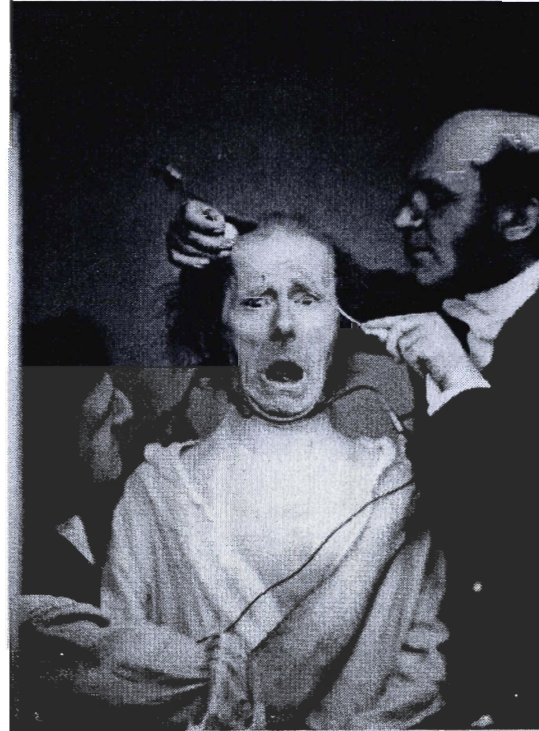


Figure 2-1: Guillaume Duchenne effectuant une stimulation électrique

Duchenne est un pionnier dans l'utilisation de l'électricité comme instrument d'expérimentations. Il s'en sert pour stimuler avec précision un seul faisceau musculaire à la fois.

Il faut également mentionner les travaux du Britannique Richard Partridge qui a décrit un cas pathologique en 1847 sur la dégénération des muscles volontaires et leur transformation en tissus adipeux [41]. De plus, il ne faut pas passer sous silence les travaux datant de 1853 accomplis par un autre Anglais du nom de William J. Little. Ce dernier a étudié certains cas pathologiques que Meryon avait également décrits quelques années auparavant [42]. Finalement, la tentative de classement des diverses dystrophies effectuée par le neurologue allemand Wilhem H. Erb est digne de mention [43].

2.2 La pathophysiologie de la DMD

La DMD affecte en moyenne une naissance mâle sur 3200 tout autour du monde [44]. Cette maladie est causée par une mutation sur le chromosome X inhibant la production d'une protéine : la dystrophine [45]. Sans cette dernière, il n'y a plus de liaisons entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine des fibres musculaires fragilisant ainsi le muscle [46, 47]. Généralement, c'est une femme porteuse qui transmet son chromosome atteint à son fils, mais le tiers des nouveaux cas est causé par une nouvelle mutation [48, 49]. Durant les trois premières années de vie, il n'y a pas vraiment de manifestations externes de la maladie. Cependant, un léger retard de croissance ainsi qu'un taux élevé de PCK sérique sont détectables [50]. Vers l'âge de cinq ans, l'enfant présentera certaines difficultés motrices et aura tendance à utiliser ses membres supérieurs pour s'aider à se relever. Cette manœuvre a été décrite pour la première fois en 1886 par William R. Gowers et elle porte son nom (Figure 2-2) [51]. La dégénérescence musculaire va progresser, affectant préférentiellement les muscles proximaux que distaux, ainsi que les régions inférieures plutôt que supérieures [52, 53].

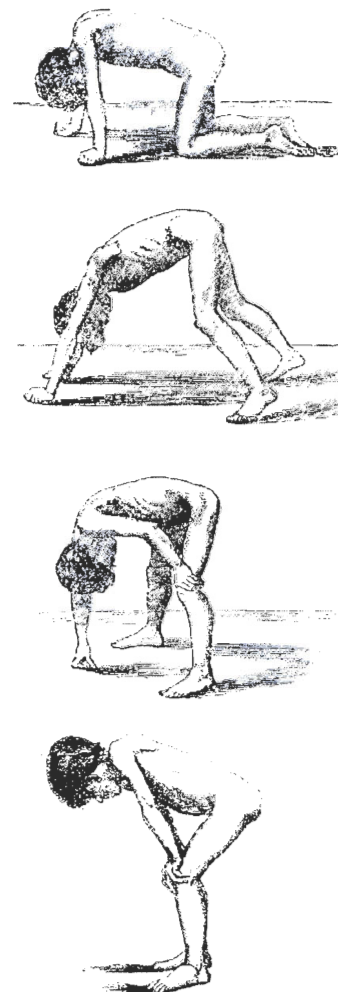


Figure 2-2: Manœuvre de Gowers
Figure tirée de Tyler 2003 [9].

L'utilisation d'une chaise roulante devient généralement nécessaire vers l'âge de 10 ans, où seulement 14% des patients dystrophiques sont capables de gravir les marches d'un escalier [54]. Dans les mêmes âges, la masse musculaire des membres supérieurs ainsi que celle du tronc commencent à faiblir de plus en plus. Après la perte des facultés ambulatoires, 75 à 90% des patients développeront une scoliose tel que démontré dans les dessins originaux de Duchenne (Figure 2-3) [55]. Une pseudo-hypertrophie de certains muscles peut être observée suite à la fibrose ainsi qu'à l'adipose. Par la suite, la dégénérescence musculaire continue pour atteindre les muscles intercostaux ainsi que le diaphragme, obligeant dans plusieurs cas le patient à utiliser une assistance respiratoire au début de la vingtaine. À ce stade avancé, bien des muscles contiennent peu de fibres musculaires et les capacités motrices sont quasi absentes. Le patient décède généralement dans la vingtaine, le plus souvent suite à une défaillance respiratoire et dans une moins grande proportion suite à une défaillance cardiaque [56].

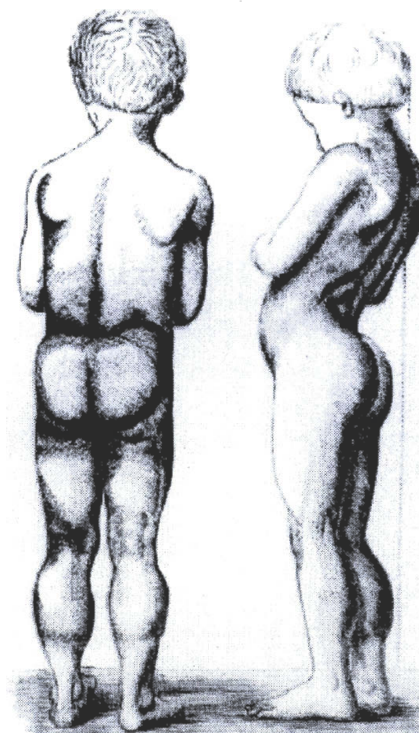


Figure 2-3: Joseph Sarrazin, premier patient de Guillaume Duchenne
Dessin inspiré d'une photographie.
Image tirée de Tyler 2003 [9].

Étant donné le développement rapide de la maladie ainsi que sa liaison au chromosome X, les probabilités qu'une femme soit atteinte sont presque nulles; il faudrait que le patient dystrophique, rivié à sa chaise roulante, ait une relation avec une femme porteuse de la DMD et que cette dernière transmette son allèle atteint. Cependant, l'expression de la DMD peut se faire chez la femme lorsque liée à une autre pathologie comme le syndrome de Turner [57], une translocation autosomale du chromosome X [58-60] ou bien encore une inactivation du chromosome X [61].

2.3 La dystrophine

La dystrophine, protéine « mal nommée », porte son nom du fait que son absence est spécifique de la DMD. Les premiers scientifiques s'attaquant à cette myopathie croyaient que cette pathologie tirait en partie son origine d'un trouble alimentaire. Ainsi, le terme dystrophie est issu de « *dus* » (en grec) : difficulté, manque et de « *trophe* » (grec également) : nourriture. Par la suite, les appellations « dystrophie » et « dystrophine » n'ont jamais été remises en question.

2.3.1 Le gène de la dystrophine

Après l'avènement des outils récents en génomique, plusieurs équipes de recherche commencent rapidement à suspecter que la DMD est une maladie génétique en lien avec les chromosomes sexuels puisque cette pathologie affecte presque uniquement les hommes. De plus, étant donné que les hommes atteints par la DMD ne se reproduisent pas, le chromosome X est d'autant plus suspecté. Ainsi, sa position sur le bras court de ce dernier est suggérée dès 1979 par l'équipe de Lindenbaum [60]. Cependant, on devra attendre en 1986 avant que l'équipe de Louis M. Kunkel identifie formellement le gène causant la DMD au niveau du locus Xp21.2 [62] et cette même équipe caractérisera ce gène plus en détail l'année suivante [63-65]. Avec ses 2,4 mégabases (Mb), le gène de la dystrophine est actuellement le gène le plus long jamais caractérisé [10]; il se compose de 79 exons, tous séparés par des introns allant jusqu'à 200 kilobases (kb). Uniquement 0,6% du gène code pour l'ARNm, ce qui fait quand même un ARNm d'un peu plus de 14 kb. Plusieurs épissages alternatifs peuvent se produire au niveau de l'ARN pré-messager et on compte actuellement au moins sept promoteurs spécifiques à certains tissus (Tableau 2-1) [66, 67]. Ainsi, on retrouve de la dystrophine au niveau du cortex cérébral [68-70], dans les cellules de Purkinje [71], dans les cellules gliales [72-74], dans les cellules de Schwann [75] et dans plusieurs autres organes [76-78].

Tableau 2-1: Les différentes isoformes de la dystrophine

| Type d'isoforme | Nom de l'isoforme | Poids mol. (kDa) | Taille du transcrit (kb) | Exons de la dystrophine présents | Promoteur | Distribution tissulaire chez l'adulte |
|-------------------|-------------------|------------------|--------------------------|----------------------------------|----------------|---------------------------------------|
| Isoformes longues | M-dystrophine | 427 | 14,0 | 1-79 | P _M | Muscle |
| | B-dystrophine | 427 | 14,0 | 1-79 | P _B | Encéphale |
| | P-dystrophine | 427 | 14,0 | 1-79 | P _P | Cervelet |
| | L-dystrophine | 427 | 14,0 | 1-79 | ??? | Lymphocytes |
| Isoformes courtes | Dp260 | 260 | 10,5 | 30-79 | ??? | Rétine |
| | Dp140 | 140 | 7,5 | 51-79 | Intron 44 | Encéphale et rein |
| | Dp116 | 116 | 5,2 | 56-79 | Intron 55 | Cellules de Schwann |
| | Dp71 | 71 | 4,5 | 63-79 | Intron 62 | Ubiquitaire |

Tableau créé à partir de [70, 71, 75, 76, 79-85]

2.3.2 La protéine

Composée d'un total de 3685 acides aminés (AA) lui conférant le respectable poids moléculaire de 427 kiloDalton (kDa), la dystrophine est la deuxième plus grosse protéine humaine, loin derrière la titine [86]. Au niveau musculaire, on retrouve cette protéine en position sub-sarcolemmique et sa fonction principale est de relier les filaments d'actine du cytosquelette à la matrice extracellulaire via son complexe protéique associé. Cette protéine se divise en quatre domaines distincts ayant chacun leurs fonctions (Figure 2-4).

En partant de la partie amino-terminale, le premier domaine est celui de liaison à l'actine et se compose des premiers 220 AA [10]. De plus, cette section de la protéine démontre une grande homologie avec les régions de liaison à l'actine des protéines de la famille des spectrines ainsi que de celle de l' α -actinine [87, 88].

Le deuxième domaine de la dystrophine se compose des AA 338 à 3055 et consiste en 24 répétitions d'une sous-unité similaire à la spectrine. Chacune de ces sous-unités possède environ 110 AA et est formée de trois hélices antiparallèles. Au niveau macroscopique, cette partie de la protéine est en forme de bâtonnet et des analyses en microscopie électronique ont démontré qu'elle mesurait entre 110 et 170 nanomètres (nm) [10].

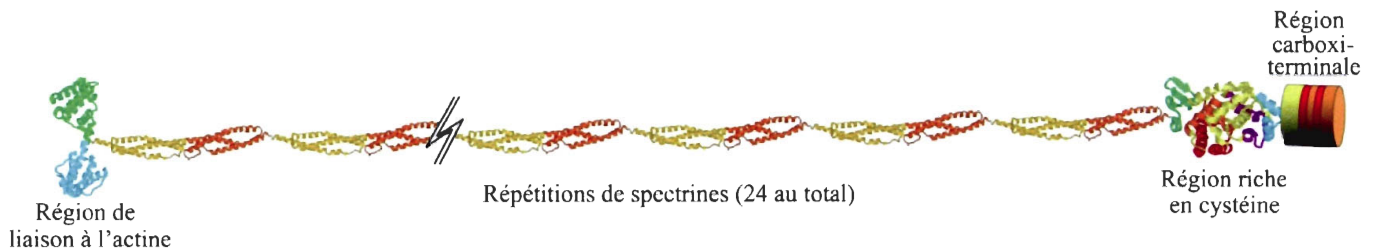


Figure 2-4: Représentation moléculaire de la dystrophine

La dystrophine se divise en quatre sous-domaines et mesure jusqu'à 170 nm. Cette protéine est très conservée entre les différentes espèces, mais le nombre de spectrines peut quant à lui varier. Image adaptée de Roberts 2001 [10].

Le troisième domaine de la protéine est la région riche en cystéines et se compose des AA 3056 à 3354. Cette section est très importante au niveau de la fonction de la dystrophine, car c'est elle, avec l'aide de l'extrémité 5' de la quatrième portion, qui assure le lien entre la dystrophine et le complexe glycoprotéique associé [89-91]. Elle est une région hautement conservée au sein des molécules de la famille de la dystrophine et elle se subdivise en trois autres sous-domaines. Le premier s'appelle WW et il est essentiellement composé de feuillettes β . Il tient son nom de la présence de deux résidus tryptophanes dans sa courte séquence de 40 AA. Le second sous-domaine est la main EF et se compose de quatre motifs en épingle à cheveux d'hélices α . Finalement, il y a le sous-domaine ZZ qui s'appelle ainsi puisqu'il a la capacité de lier certains ions Zn^{2+} , mais la fonction précise de ce dernier domaine reste encore inconnue [92].

Le quatrième domaine de la dystrophine est la région carboxy-terminale et comprend les résidus aminés 3355 à 3685. Cette section de la dystrophine ne semble pas essentielle au niveau musculaire tel que démontré dans plusieurs expériences chez la souris ainsi que chez certains patients présentant des mutations rares [93]. Son extrémité 5' est composée d'hélices α et peut servir de liaison à certaines protéines cytoplasmiques [94]. Pour ce qui est de son extrémité 3', elle ne semble pas avoir de fonction bien définie. Cette section de la dystrophine peut avoir plusieurs épissages alternatifs surtout au niveau des tissus non-musculaires.

2.3.3 Le complexe associé

Le complexe associé est un regroupement de 18 protéines distinctes faisant le lien entre la dystrophine, en position subsarcolemmique, et les filaments d'actine de la matrice extracellulaire [95]. Plus spécifiquement, les protéines composant le complexe associé sont : la laminine- $\alpha 2$ (mérosine), les dystroglycans (α et β), les sarcoglycans (α , β , δ , ϵ et γ), la sarcospan, la dystrobrevine, les syntrophines ($\alpha 1$, $\beta 1$ et $\beta 2$), la « *nitric oxide synthase* » (NOS), la kinase « *microtubule associated serine/threonine* » (MAST) de 205 kDa, la syncoiline, la calvéoline-3 ainsi que le « *growth factor receptor-bound protein 2* » (Grb2) [7] (Figure 2-5). L'absence d'une seule protéine au sein de ce complexe peut avoir de graves répercussions au niveau physiologique en provoquant par exemple d'autres types de dystrophies musculaires (Chapitre 2.7).

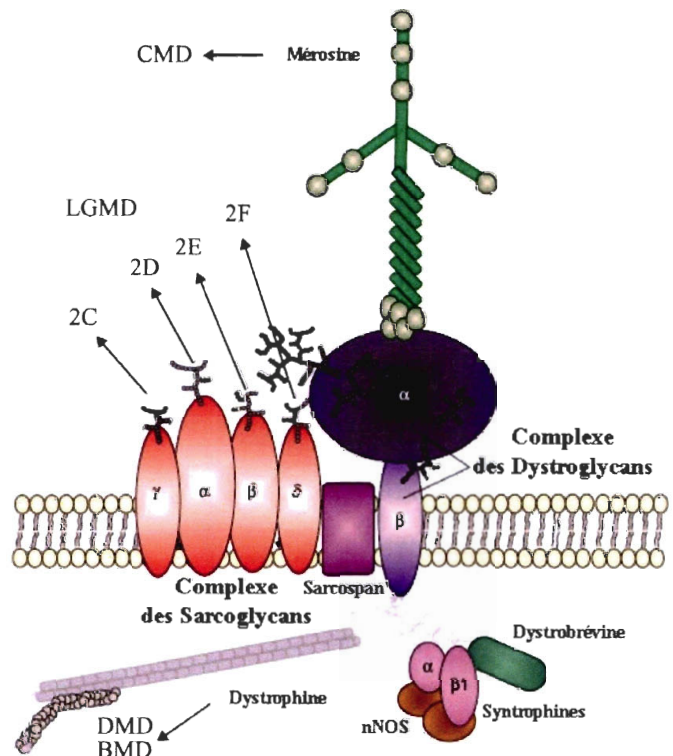


Figure 2-5: Le complexe glycoprotéique associé à la dystrophine

Le complexe glycoprotéique associé à la dystrophine est composé de 18 protéines et lie la dystrophine à la matrice extracellulaire. Image adaptée de Stephan 2007 [7].

2.4 Les modèles animaux dystrophiques

De nos jours, il y a trois types de modèles animaux n'ayant aucune expression de dystrophine qui sont à la disposition des équipes de recherche. Ces modèles sont la souris « *muscular dystrophy X-linked* » (MDX), le chat « *hypertrophic feline muscular dystrophic* » (HFMD) ainsi que le chien « *Golden Retriever muscular dystrophic* » (GRMD).

2.4.1 La souris MDX

La souris MDX a été découverte tout à fait par hasard en 1984 par l'équipe de Graham Bulfield suite à une série d'observations dénotant entre autres un taux sérique de PCK anormalement élevé chez une souris C57Bl/10JScSn [96]. De plus, ce taux sérique élevé de PCK était corrélé avec une mutation sur le chromosome X laissant présager une homologie de mutation avec le gène de la dystrophine humaine. Cependant, ce n'est que quelques années plus tard, lors de la découverte du gène de la dystrophine humaine, que l'on a pu confirmer officiellement cette théorie [63]. Plus précisément, la mutation chez la souris MDX est une mutation ponctuelle non-sens qui amène une thymine au lieu de la cytosine au niveau de la 3185^e paire de nucléotides du chromosome 23 [97-99]. Cette mutation transforme ainsi un codon glutamine (CAA) par un codon stop (TAA), menant à l'arrêt prématuré de la traduction de la dystrophine pleine longueur (Dp427), qui sera rapidement dégradée. Il est à noter que cette mutation n'affecte aucunement les autres isoformes de la dystrophine (Dp260, Dp140, Dp116 et Dp71) [100].

Au niveau phénotypique, la souris MDX est plus ou moins un bon modèle car elle n'est que très peu affectée par l'absence de la dystrophine; aucune amyotrophie n'est notable avant 18 mois et sa prise de poids est comparable à celle de souris témoins [101-103]. De plus, leur faiblesse musculaire est très minime et controversée; certains scientifiques dénotent une faiblesse musculaire transitoire en bas âge [98, 104], d'autres ne voient une différence qu'à partir de 16 mois [105, 106] ou 20 mois [107], tandis que d'autres n'en voient pas du tout [108, 109]. Finalement, la seule différence notable autre que le taux élevé de PCK dans la première année de vie est une espérance de vie se situant entre 20 et 24 mois, comparativement à 30 mois pour une souris saine [26, 106, 110].

Avec les années et l'élaboration d'outils génétiques récents, une foule de souris dystrophiques ont été créées par mutagenèse chimique. La plupart de ces modèles ont un phénotype clinique et lésionnel similaire à la MDX (Tableau 2-2).

Tableau 2-2: Survol de différents types de souris MDX

| Nom du variant | Anomalie génétique | Expression des isoformes | | | | | Phénotype clinique & lésionnel |
|------------------|---|--------------------------|-------|-------|-------|------|---|
| | | Dp427 | Dp260 | Dp140 | Dp116 | Dp71 | |
| MDX2cv | Mutation ponctuelle au niveau de l'intron 42 | O | O | I | I | I | Identique à la MDX |
| MDX3cv | Transition T vers A dans l'intron 65 | O | O | O | O | O | Survie néonatale ↓ 47% N. de souriceaux ↓ 5x Taille des fibres + hétérogène |
| MDX4cv | Transition C vers T dans l'exon 53 | O | O | O | I | I | Identique à la MDX Taille des fibres + hétérogène |
| MDX5cv | Délétion de 53 paires de bases dans l'exon 10 | O | I | I | I | I | Identique à la MDX 10x plus de fibres révertantes |
| MDX52 | Souris KO sur l'exon 52 | O | O | O | I | I | Identique à la MDX 10x plus de fibres révertantes |
| MDX Δ71-74 | Délétion des exons 71 à 74 | O | ??? | ??? | ??? | ??? | Asymptomatique & sans lésion |
| MDX Δ64-67 | Délétion des exons 64 à 67 | O | ??? | ??? | ??? | ??? | Sévère |
| MDX Δ68-70 | Délétion des exons 68 à 70 | O | ??? | ??? | ??? | ??? | Identique à la MDX |
| MDX : UTR -/- | Double-déficiences dystrophine et utrophine | O | ??? | ??? | ??? | ??? | Similaire à celui de la DMD |
| MDX : MyoD -/- | Double-déficiences dystrophine et MyoD | O | ??? | ??? | ??? | ??? | Sévère |
| MDX3cv : Utr -/- | Double-déficiences dystrophine et Utrophine | O | O | O | O | O | Similaire à celui de la DMD |
| MDX : nNOS -/- | Double-déficiences dystrophine et nNOS | O | I | I | I | I | Identique à la MDX |

Tableau créé à partir de [100, 111-125]

2.4.2 Le chat HFMD

La myopathie hypertrophique féline est, comme son nom l'indique, caractérisée principalement par une hypertrophie. À ce jour, uniquement trois populations dystrophinopathes ont été identifiées dont deux chats mâles castrés sans aucune descendance connue [126]. Une autre population est à l'origine de la seule lignée bien établie et ne présente aucune expression de la dystrophine [127]. Les causes génétiques de cette myopathie féline ne sont pas encore bien comprises, mais nous savons que l'origine de cette pathologie n'est pas une délétion [126]. Une dernière population de chat HFMD a été découverte au milieu des années 1990 et se présente par une délétion spontanée de 200 kb au niveau du promoteur P_M et P_P de la dystrophine, inhibant ainsi son expression au niveau du muscle et du cervelet (cellules de Purkinje) [128].

Au niveau phénotypique, il n'y a pas vraiment de faiblesse musculaire présente chez les animaux, mais une hypertrophie généralisée est notable. De plus, un épaississement de la langue, une rigidité cervicale et certains troubles locomoteurs peuvent survenir [129, 130]. Au niveau de l'apparition des premiers signes cliniques, l'âge varie entre deux et 21 mois selon les différentes équipes de recherche [126, 130, 131]. La différence des symptômes entre le chat et les patients DMD, les différences de coûts engendrés par l'achat et l'hébergement, en combinaison avec la rareté des animaux, font que ce modèle n'est que très peu utilisé pour la recherche.

2.4.3 Le chien GRMD

Les différents modèles canins atteints de dystrophinopathie sont actuellement les plus proches de la forme humaine de la DMD. À l'origine, la maladie a été observée chez un Golden Retriever mâle vers la fin des années 80 [132, 133]. Par la suite, différentes colonies ont émergé à partir de cet individu en le croisant avec d'autres Golden Retrievers ou bien avec des Beagles pour diminuer la taille des chiens [133, 134]. Depuis ce temps, une dystrophinopathie a été observée chez d'autres races de chiens tels le Rottweiler, le Samoyède, le Terrier ainsi que le Pointer [7, 135, 136].

Chez le Golden Retriever, la maladie a très bien été caractérisée. Au niveau génétique, c'est une mutation d'un G vers un A au niveau de l'intron six qui engendre une absence de l'exon sept dans l'ARNm changement ainsi le cadre de lecture et aboutissant à un codon-stop au niveau de l'exon huit. Ainsi, un ARNm tronqué et instable est produit, correspondant à la partie amino-terminale de la protéine [137-141]. En ce qui concerne la pathophysiologie de la maladie, elle se concrétise dès la naissance par un taux sérique de PCK élevé. Entre huit et dix semaines, le chiot se fatigue très rapidement et présente une démarche anormale : rigidité des membres, foulées courtes, démarche en « sauts de lapins » [142, 143]. De plus, les aboiements sont de faible intensité et il leur est impossible d'ouvrir complètement la mâchoire. Par la suite, les signes cliniques s'aggravent progressivement jusqu'à l'âge de six mois avant de se stabiliser. Finalement, une euthanasie est généralement nécessaire avant l'âge de deux ans suite à une insuffisance cardiaque terminale [142] ou bien suite à une pneumonie [132].

Comme mentionné précédemment, les chiens dystrophiques sont d'excellents modèles d'étude pour la DMD. Cependant, les coûts d'exploitation tels l'achat, l'hébergement et les soins spéciaux font en sorte que cet outil de travail n'est pas à la portée de toutes les équipes de recherche. Ainsi, ce modèle va être principalement utilisé au niveau des protocoles pré-cliniques.

2.5 Les principales thérapies non-cellulaires

À ce jour, aucune thérapie ne permet d'endiguer ou de ralentir efficacement l'évolution de la pathologie de la DMD. Les seuls traitements actuels sont d'ordre palliatif et visent à faciliter la vie des patients. Par exemple, il peut y avoir l'utilisation d'une canne, la physiothérapie, une chaise roulante, une assistance respiratoire, etc. De plus, des opérations chirurgicales peuvent être envisagées dans certains cas, comme ceux des lordoses pathologiques où l'on fixe une tige métallique à la colonne vertébrale dans le but d'éviter les affaissements [47]. En ce qui concerne les diverses thérapies envisageables dans un avenir quelconque, on compte les thérapies pharmacologique, génétique et cellulaire.

2.5.1 La thérapie pharmacologique

2.5.1.1 Les glucocorticoïdes

Actuellement, certains médicaments anti-inflammatoires pourraient aider à ralentir la progression de la maladie. À l'origine, certaines études tendaient à démontrer qu'une hormone de type glucocorticoïde, la prednisone, permettrait de prolonger d'environ deux ans la durée de marche des patients. Le mode d'action de ces anti-inflammatoires sur cette pathologie n'est pas très bien établi, mais une réduction de l'inflammation musculaire chronique réduisant significativement l'infiltration de tissus cicatriciels est une théorie bien acceptée [144, 145]. Par après, ce sont deux dérivés de cette drogue, le Déflzacort et la prednisolone, qui se sont avérés prometteurs en présentant moins d'effets secondaires ainsi que des résultats encourageants chez la souris MDX [146-150]. Cependant, même si les effets secondaires sont diminués et admissibles d'un point de vue clinique avec ces deux drogues, les effets résultant d'une administration continue sur une longue période n'ont jamais été évalués [151, 152].

2.5.1.2 Les antibiotiques

Un autre traitement pharmacologique possible est l'utilisation de certains antibiotiques ayant la capacité d'interférer avec divers processus génomiques de la cellule. En effet, certains dérivés de la gentamicine, appelés aminoglycosides, produisent une « relaxation » au niveau de l'ARNm, permettant de passer outre un codon-stop lorsqu'administrés en dose massive. Ce phénomène permettrait de restaurer entre 10 et 20% d'expression de la dystrophine chez la souris [153, 154]. Plus récemment, la compagnie PTC Therapeutics a mis au point une nouvelle molécule ayant des propriétés similaires, la PTC124. Selon les estimés initiaux de la compagnie, il existe 2400 maladies génétiques différentes induites par une mutation non-sens chez un pourcentage significatif de patients. Actuellement, plusieurs études cliniques ont été effectuées et une phase 2b devrait voir le jour au début de 2009 [155, 156].

2.5.1.3 La myostatine

Une autre thérapie pharmacologique envisageable utilise le système de la myostatine/follistatine [157-159]. La myostatine est une protéine appartenant à la grande famille des « *transforming growth factor β* » (TGF- β) qui inhibe la prolifération ainsi que de la division des myoblastes [160-162]. La follistatine ainsi que les « *follistatine related proteins* » (FLRP), quant à elles, sont des antagonistes de la myostatine qui se lient directement à elle, créant ainsi un encombrement stérique [163, 164]. Dans la nature, il est relativement fréquent que des animaux aient une mutation au niveau du gène de la myostatine, ce qui inhibe toute production de cette protéine et créant du coup une hypertrophie musculaire généralisée [165-167] (Figure 2-6). Chez l'homme, seulement deux cas ont été officiellement recensés, un en Allemagne et un aux États-Unis, démontrant également une hypertrophie malgré le bas âge des deux garçons [168]. Il a déjà été démontré chez la souris MDX que tant l'utilisation d'anticorps bloquants dirigés contre la myostatine que l'injection de follistatine ou de FLRP pourraient favoriser une hypertrophie musculaire menant à une amélioration fonctionnelle [169]. De plus, diverses expériences menées dans notre laboratoire ont démontré qu'une surexpression de follistatine favorisait significativement le succès de greffe de myoblastes chez des souris MDX [170]. Évidemment, cette approche thérapeutique ne restaure pas à elle seule l'expression de la dystrophine, mais elle pourrait être utile en combinaison avec la thérapie cellulaire,



Figure 2-6: Un chien sans myostatine

Ce « *Bully Whippet* » a une double mutation au niveau du gène de la myostatine causant une hypertrophie très prononcée. Image adaptée de Westad 2007 [4].

2.5.2 La thérapie génique

La thérapie génique est une technique thérapeutique qui consiste à introduire dans l'organisme un gène préparé en laboratoire, en vue de traiter notamment des maladies génétiques, des cancers, des infections, etc. [171]. Ainsi, dans le cas de la DMD, plusieurs équipes de recherches tentent d'introduire la dystrophine, ou un des homologues fonctionnels, afin de restaurer en partie ou totalement l'expression de la dystrophine au niveau musculaire. Chez la souris, il a déjà été démontré qu'une restauration à 70% de la dystrophine pleine longueur éliminait quasiment tous les signes pathologiques et rétablissait le complexe associé [172, 173]. Cependant, il est très difficile de provoquer l'expression systémique de la dystrophine sans effets secondaires indésirables, mais une foule de techniques prometteuses sont présentement à l'étude.

2.5.2.1 Les AAV

Actuellement, une des approches virales les plus intéressantes utilise des « *adeno-associated virus* » (AAV), qui sont à l'origine des petits virus à ADN non-pathogènes. Par le biais du génie génétique, ces virus sont dépourvus de tout gène viral et peuvent servir de vecteur pour amener le matériel génétique souhaité à l'intérieur des cellules. Ce type de virus est intégratif et les sérotypes 1, 6 et 8 ont une excellente capacité d'infection musculaire, et ce malgré une injection systémique [174-176]. Cependant, la capacité d'encapsulation est limitée à environ 5 kb, ce qui est insuffisant pour la dystrophine pleine longueur, mais assez pour un de ses homologues tronqués : la micro-dystrophine avec ses 3,8 kb [177-179]. L'injection d'un AAV-micro-dystrophine chez la souris MDX a donné des résultats très intéressants en infectant presque tous les muscles striés squelettiques ainsi qu'une certaine proportion du muscle cardiaque, rétablissant ainsi l'expression d'une protéine très similaire à la dystrophine [176]. Néanmoins, il y a toujours une réaction immune dirigée contre ce vecteur viral et l'injection de fortes doses, pourrait déclencher une réaction inflammatoire létale chez le patient [180, 181]. Actuellement, 10^{16} génomes viraux seraient nécessaires pour voir ce type de résultats.

2.5.2.2 Le saut d'exon

Comme il a été mentionné précédemment, une délétion changeant le cadre de lecture est la source du problème chez plusieurs patients DMD. Le saut d'exon thérapeutique est une méthode qui agit au niveau de l'ARN pré-messager pour supprimer la partie du gène portant un codon-stop prématuré ou bien pour rétablir le cadre de lecture suite à une délétion [172]. Ainsi, au lieu de ne pas avoir de dystrophine du tout, les patients expriment une dystrophine tronquée, mais fonctionnelle, appelée quasi-dystrophine. Avec cette dernière, les patients DMD voient leur profil pathologique évoluer vers l'équivalent de celui d'un patient atteint par la dystrophie musculaire de Becker [182, 183] (voir la section 2.7.1 La dystrophie musculaire de Becker). Théoriquement, environ 60% des patients DMD pourraient être traités par cette thérapie [172]. Pour ce faire, il suffit d'introduire des oligonucléotides anti-sens (AONs), composés de petits ARN nucléaires (snRNA), au niveau de la fibre musculaire via un AAV afin que ces derniers s'hybrident avec l'ARN pré-messager de la dystrophine. Se faisant, ils empêchent le mécanisme d'épissage normal d'avoir lieu et l'exon tout comme les introns le bordant sont excisés [184, 185]. Actuellement, les thérapies utilisant des AONs qui se sont rendues aux essais cliniques utilisent des voies d'administration intramusculaire [186], mais plusieurs équipes tentent présentement d'optimiser des méthodes d'injection systémique chez la souris [187-190].

Quoiqu'attrayante au premier coup d'œil, cette méthode comprend aussi son lot d'inconvénients. Tous d'abord, bien qu'une bonne amélioration soit visible, le patient n'est jamais complètement guéri; il reste à un phénotype de Becker. Aussi, avec une demi-vie variant entre deux et quatre mois, les AONs sont instables dans le temps et les patients nécessiteraient donc une prise continue d'AONs tout au long de leur vie [188]. De plus, un examen moléculaire précis de chaque patient doit être fait pour déterminer sur quel exon se situe sa mutation ou pour identifier quels exons sont absents, pour ensuite synthétiser de manière spécifique des AONs avant de commencer le traitement. Finalement, le cœur semble difficilement atteignable par les injections systémiques [191], la toxicité à long terme de ces AONs n'a jamais vraiment été étudiée en détail [192, 193] et leur accumulation dans l'organisme pourrait s'avérer très néfaste au niveau systémique.

2.5.2.3 La correction génomique

Au même titre que la souris MDX, environ 15% des patients DMD développent cette maladie suite à une mutation ponctuelle. L'utilisation d'oligodésoxynucléotides pourrait permettre de corriger génétiquement cette mutation [194]. Les oligodésoxynucléotides sont des petites séquences nucléotidiques ayant une homologie de séquence parfaite pour une région chevauchant la mutation, à l'exception de la mutation elle-même où la base complémentaire sauvage est insérée. Lors du déroulement de la double hélice de l'ADN, l'oligodésoxynucléotides va aller se fixer à sa séquence complémentaire et le non-appariement au niveau de la mutation va stimuler le système de réparation de l'ADN. Les premiers essais chez la souris ont été très prometteurs avec des corrections tant au niveau génomique qu'au niveau de l'ARNm [195-197]. Encore une fois cependant, cette méthode comporte son lot de désavantages. Ainsi, il faut déployer le génie génétique pour créer les oligodésoxynucléotides pour chacune des mutations. Également, l'efficacité maximale de cette méthode est actuellement de 5%. Finalement, cette thérapie affecte les cellules en division et non les cellules satellites. Le renouvellement cellulaire important qui se produit au niveau musculaire provoquerait ainsi une diminution graduelle du pourcentage de cellules exprimant la dystrophine. Cette diminution du pourcentage serait donc corrélée directement avec une diminution de la force des fibres et nécessiterait un traitement continu avec des oligodésoxynucléotides [194].

2.6 La thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire consiste tout simplement à transplanter chez des patients Duchenne des précurseurs musculaires contenant le gène normal de la dystrophine, ou d'une autre protéine musculaire manquante pour d'autres types de dystrophies. Les myoblastes provenant d'une biopsie musculaire faite chez une personne saine ont été jusqu'à présent le type cellulaire le plus étudié. Il y a aussi la possibilité d'utiliser les propres myoblastes du patient modifiés génétiquement *in vitro*. De plus, l'avènement des cellules souches nous ouvre d'autres portes avec une quantité de cellules quasi inépuisable. Finalement, plusieurs cellules pourraient éventuellement remplacer les myoblastes comme les *muscle derived stem cells* [198, 199], les mésoangioblastes [200, 201] et les péricytes [200].

2.6.1 La transplantation de myoblastes normaux

Effectuer une transplantation de myoblastes est quand même assez simple (Figure 2-7). Comme il vient d'être mentionné, il faut effectuer une biopsie musculaire chez un donneur sain. Par la suite, on effectue une dissociation mécanique ainsi qu'enzymatique au niveau de la biopsie. À cette étape, un enrichissement en myoblastes peut être fait par la collecte du surnageant après une heure de culture, puisque les fibroblastes adhèrent beaucoup plus rapidement au pétri que les myoblastes. Ensuite, les myoblastes sont mis en culture afin de stimuler leur prolifération jusqu'à obtenir la quantité nécessaire de cellules. Finalement, les cellules sont trypsinisées et

concentrées par centrifugation avant d'être injectées dans le muscle du patient [202-204]. Le bris causé lors de l'injection intramusculaire, conjointement avec le phénomène de dégénération-régénération, feront en sorte que les nouveaux myoblastes vont fusionner au niveau des fibres déjà existantes ce qui rétablira l'expression de la dystrophine [205]. Il est à noter que cette technique peut aussi être utilisée afin de réparer des bris au niveau du muscle cardiaque suite à un infarctus [206-208]. Évidemment, cette thérapie comporte aussi quelques complications qui seront abordées à la section 2.6.4.

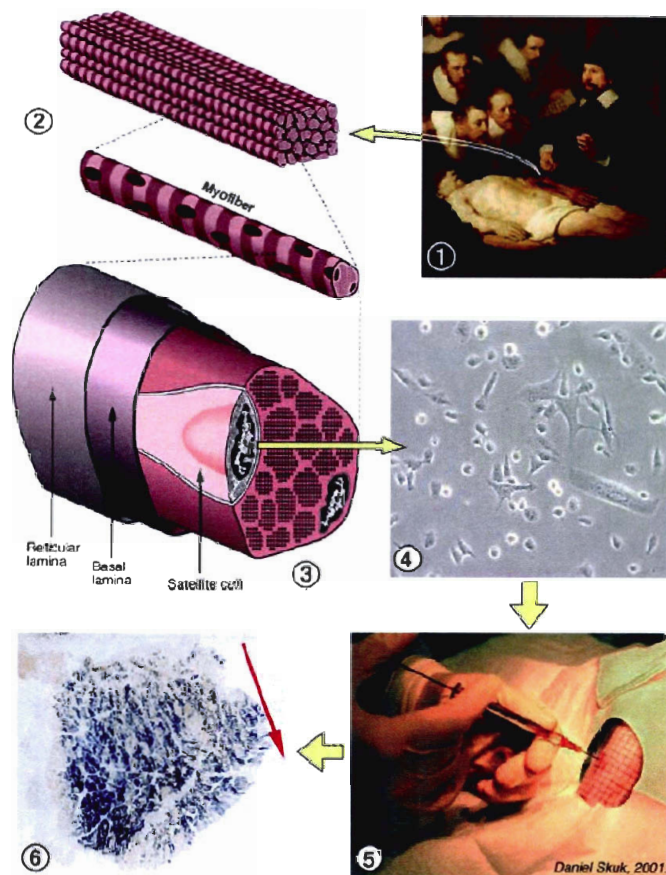


Figure 2-7: Schématisation de la thérapie cellulaire
Les étapes d'une transplantation de myoblastes sont très simples: 1 & 2 : Biopsie; 3 & 4 : Culture; 5 & 6 : Transplantation. Image tirée de Skuk 2000 [12].

2.6.2 La transplantation de myoblastes modifiés génétiquement

2.6.2.1 Modifications génétiques des myoblastes

Pour contrer certains problèmes reliés à l'utilisation de myoblastes normaux, certaines équipes tentent depuis longtemps de modifier génétiquement les myoblastes avant de les greffer. Par exemple, il est possible de forcer l'expression d'un récepteur dominant négatif pour la myostatine (dnActRIIB) afin de favoriser le développement des cellules transplantées au dépend des cellules satellites endogènes du patient [209]. Il y a également plusieurs moyens géniques pour augmenter la migration ainsi que la fusion des myoblastes. Par exemple, la surexpression de certains récepteurs comme le CXCR4 a donné des résultats encourageants [210, 211]. Aussi, afin d'avoir une concordance quasi parfaite au niveau immunologique, les cellules du patient lui-même peuvent être infectées/transfectées/nucléofectées avec la dystrophine *in vitro* [212]. De plus, la cotransfection avec certaines intégrases, comme la phiC31 par exemple, peut mener à une expression beaucoup plus stable dans le temps de la dystrophine via une intégration de plasmides allant jusqu'à 21 kb [213].

2.6.2.2 Préconditionnement, co-injection, et autres

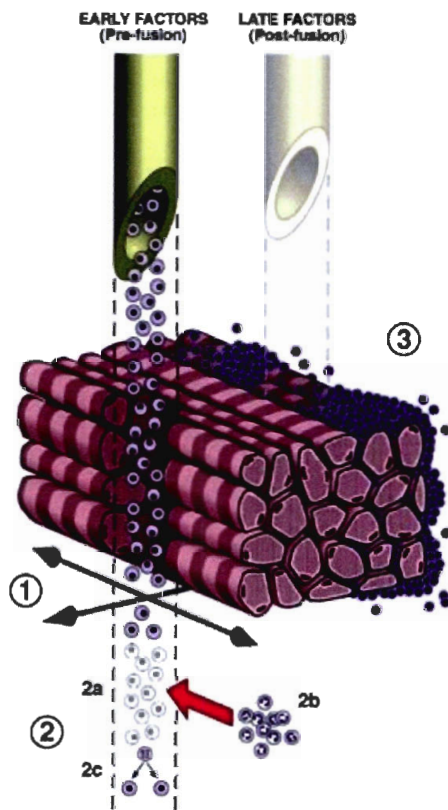
Une foule de possibilités moins invasives que les modifications génétiques peuvent aussi améliorer grandement le succès de greffe de myoblastes chez les patients. Tout d'abord, certains preconditionnements à la chaleur augmentent la survie cellulaire via la production de protéines de choc thermique comme celle de la famille des HSP70 [214]. Dans le même ordre d'idées, certains preconditionnements à l'hypoxie peuvent également diminuer de manière significative la mort cellulaire [215, 216]. La co-injection de certains facteurs motogéniques comme l'interleukine de type 4 (IL-4), le « *insulin growth factor type 1* » (IGF-1) ou le « *basic fibroblast growth factor* » (bFGF) peuvent, quant à eux, favoriser la migration des myoblastes et diminuer ainsi le nombre d'injections requises pour traiter un patient dystrophique [217, 218]. De plus, le simple fait de forcer un certain exercice physique peut augmenter le succès de la greffe [219].

2.6.3 La transplantation de myoblastes dérivés de cellules souches

Depuis quelques années, les recherches au niveau des cellules souches ont pris énormément d'ampleur et présentent des potentiels formidables. Au niveau musculaire, il a déjà été démontré qu'il était possible de différencier des cellules souches en cellules myogéniques via des virus codant pour des gènes myogéniques tels Pax7, MyoD, Myf5, etc. [220-223]. Cette découverte a réglé en bonne partie le problème de la quantité astronomique de cellules nécessaires pour traiter un seul patient via la thérapie cellulaire; avec les cellules souches, nous pouvons avoir un nombre quasi infini de cellules. De plus, en dérivant ces mêmes cellules souches en cellules hématopoïétiques ou bien en cellules souches hématopoïétiques, nous pourrions créer une tolérance immunologique spécifique envers les cellules dérivées des mêmes cellules souches. En effet, en modifiant légèrement le protocole de tolérance centrale mis au point par le Dr Stephan, le TTCB (Voir la section 3.5.1.4 Le TTCB), il serait théoriquement possible d'obtenir un chimérisme hématopoïétique hôte-cellule souche et ainsi avoir une tolérance pour toute greffe de cellules dérivées de ces mêmes cellules souches [1].

2.6.4 Les barrières à la thérapie cellulaire

Quoique le but ultime de la thérapie cellulaire est de guérir complètement les patients DMD tout en les amenant à une espérance de vie normale, le but actuellement fixé par les équipes travaillant sur cette thérapie est d'améliorer la qualité de vie de ceux-ci. Par exemple, des greffes de myoblastes pourraient être faites uniquement dans les bras d'un patient pour qu'il puisse en garder l'usage jusqu'à la fin de sa vie ou bien dans les jambes, afin qu'il puisse se mouvoir sans assistance. Pour ce qui est d'un traitement systémique, il est un peu plus difficile de penser faire une injection à tous les millimètres sur tout le corps, mais c'est théoriquement possible. Néanmoins, il y a des régions qui sont beaucoup plus problématiques que d'autres. Par exemple, aller injecter le diaphragme serait très important étant donné que la majorité des patients présentent une insuffisance respiratoire, mais aller y insérer une aiguille n'est pas chose facile. Outre le problème d'accessibilité de certaines régions du corps, cette thérapie présente quelques autres problèmes qui nécessitent présentement une optimisation (Figure 2-8).



Skuk & Tremblay. Figure 4.

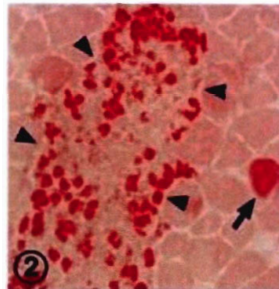
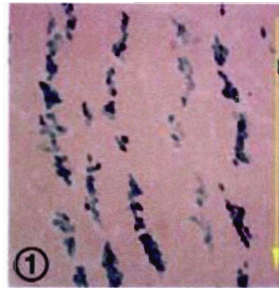


Figure 2-8: Problèmes majeurs liés à la thérapie cellulaire

1) Une faible migration des cellules transplantées : cellules marquées à la β -galactosidase démontrent clairement que les cellules transplantées restent au site d'injection.

2) Une mort cellulaire importante suite à la transplantation : marquage du calcium intracellulaire démontre un taux de mortalité élevé au niveau du site d'injection.

3) Une réponse immunitaire dirigée contre les cellules transplantées : infiltration lymphocytaire au site d'injection.

Image tirée de Skuk 2003 [204].

2.6.4.1 La migration des myoblastes transplantés

Pour rétablir l'expression de la dystrophine via la thérapie cellulaire, il faut que les myoblastes transplantés fusionnent avec les fibres dystrophine-négatives du patient. Pour ce faire, un contact direct est évidemment nécessaire entre la fibre et le myoblaste transplanté. Cependant, une fois injectés dans le muscle, les myoblastes ne sont pas naturellement portés à migrer tout le long des fibres ou vers d'autres fibres non-endommagées et restent donc plus ou moins au site d'injection (Figure 2-8 : partie 1) [224, 225]. Ainsi, une injection à chaque millimètre est actuellement nécessaire pour couvrir toute la superficie du muscle, ce qui rend ce protocole assez invasif. Cependant, si la migration pouvait être augmentée ne serait-ce que d'un millimètre, le nombre d'injections requises pour couvrir un centimètre carré passerait de 100 à 25, soit une diminution de 75%.

2.6.4.2 La mort cellulaire

Une fois transplantés, une vague de mortalité s'abat sur les myoblastes, tuant entre 50 et 75% de ces derniers [226, 227]; certaines études affirment même que ce taux frise les 99% [228] (Figure 2-8 : partie 2). Outre une intervention du système immunitaire, plusieurs facteurs sont responsables de ce très haut taux de mortalité comme l'hypoxie [229], l'ischémie [230] et l'anoikis [231]. Plusieurs traitements sont présentement sous optimisation pour diminuer ce taux et ainsi diminuer la quantité de cellules nécessaires. Parmi ceux-ci, on compte l'induction de protéines de choc thermique [214, 232] ainsi que des préconditionnements à l'hypoxie [215, 216, 233].

2.6.4.3 La réponse immunitaire

Étant donné que les problèmes de migration et de mort cellulaire peuvent se régler par plus d'injections ou plus de myoblastes, le principal problème de cette thérapie est celui du rejet immunitaire. En effet, il est possible d'observer une importante infiltration lymphocytaire suite à une greffe sans immunosuppression de myoblastes allogéniques [234] (Figure 2-8 : partie 3). Ainsi, après deux semaines, il n'y a plus aucune fibre dystrophine positive décelable dans le muscle greffé. De plus, il est impossible d'envisager une immunosuppression durant toute la vie du patient dystrophique étant donné la toxicité à long terme des protocoles actuels. Au niveau syngénique, le rejet immunitaire est bien moins fort et des fibres exprimant la dystrophine peuvent être observables jusqu'à neuf mois après la transplantation [235]. Cependant, les fibres musculaires vont exprimer de la dystrophine qui va être perçue par l'hôte comme étant une protéine exogène. Un rejet immunitaire va être possible via une présentation par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-1) des fibres musculaires. Bref, pour que la thérapie puisse être un traitement des dystrophies, il faudra d'abord développer un système de tolérance immunologique.

2.7 Les autres types de dystrophies musculaires

Il existe neuf familles de dystrophies classées principalement selon leur pathophysiologie. Le tableau 2-3 est une compilation exhaustive de toutes les myopathies actuellement connues et les plus importantes sont sommairement décrites dans ce sous-chapitre.

Tableau 2-3: Classement des dystrophies

| Type | Maladies | Transmission | Loci | Protéine en cause |
|-------------------------------|------------------|--------------|--|--------------------------------|
| Les dystrophies des ceintures | LGMD1A | AD | 5q31 | Myotiline |
| | LGMD1B | AD | 1q21.2 | Lamine A/C |
| | LGMD1C | AD | 3p25 | Calvéoline-3 |
| | LGMD1D | AD | 7q | ??? |
| | LGMD1E | AD | 6q23 | ??? |
| | LGMD1F | AD | 7q32.1-q32.2 | ??? |
| | LGMD1G | AR | 4q21 | ??? |
| | LGMD2A | AR | 15q15.1-q21.1 | Calpaïne 3 |
| | LGMD2B | AR | 2p13.3-p13.1 | Dysferline |
| | LGMD2C | AR | 13q12 | Sarcoglycan-γ |
| | LGMD2D | AR | 17q12-q21.33 | Sarcoglycan-α |
| | LGMD2E | AR | 4q12 | Sarcoglycan-β |
| | LGMD2F | AR | 5q33 | Sarcoglycan-δ |
| | LGMD2G | AR | 17q12 | Téléthonine |
| | LGMD2H | AR | 9q31-q31.4 | TRIM32 |
| | LGMD2I | AR | 19q13.3 | FKRP |
| | LGMD2J | AR | 2q31 | Titine |
| | LGMD2K | AR | 9q34.1 | POMT1 |
| LGMD2L | AR | 11p13-p12 | Dystroglycan-α | |
| LGMD2M | AR | 9q31 | Fukutine | |
| LGMD2N | AR | 14q24.3 | POMT2 | |
| Les dystrophies congénitales | MDC1A | AR | 6q22-q23 | Laminine-α2 |
| | MDC1B | AR | 1q42 | ??? |
| | MDC1C | AR | 19q13.3 | FKRP |
| | MDC1D | AR | 22q12.3-q13.1 | LARGE |
| | MEBD | AR | 19q13.3, 1p34-p33 | POMGNT1 |
| | Ullrich | AR | 2q37, 21q22.3, 21q22.3 | Collagène-6 (A1, A2, A3) |
| | RSMD1 | AR | 1p36-p35 | Sélénoprotéine-1 |
| | Fukuyama | AR | 9q31 | Fukutine |
| | Walker-Warburg | AR | 9q31;34.1, 14q24.3, 19q13.3, 22q12.3-q13.1 | POMT1/2, FKRP, Fukutine, LARGE |
| | ITGA7 deficiency | AR | 12q13 | Intégrine-α7 |
| Les dystrophies distales | Udd | AD | 2q31 | Titine |
| | Miyoshi | AR | 2p13.3-p13.1 | Dysferline |
| | Welander | AD | 2p13 | ??? |
| | Laing (MPD1) | AD | 14q12 | MyHC |
| | Nonaka (HIBM) | AR | 9p12-p11 | GNE |
| Les dystrophies myotoniques | DM1 (Steiner) | AD | 19q13 | Myotonine-1 |
| | DM2 (PROMM) | AD | 3q13.3-q24 | Zinc finger protein-9 |
| FSHD | FSHD | AD | 4q35 | Fragment D4Z4 |
| OPMD | OPMD | AD | 14q11.2-q13 | Poly(A)-binding protein 2 |
| EDMD | EDMD1 | Lié à X | Xq28 | Émerine |
| | EDMD2 | AD | 1q21.1, 1q21.2 | Lamine A/C |
| | EDMD3 | AR | 1q21.1, 1q21.2 | Lamine A/C |
| BMD | BMD | AR | Xp21.1 | Dystrophine |
| DMD | DMD | AR | 12q21, Xp21.2 | Dystrophine |

Tableau créé à partir de [236-262]

2.7.1 La dystrophie musculaire de Becker

La BMD (Becker Muscular Dystrophy) est une dystrophinopathie très similaire à la DMD, mais présentant chez les patients atteints des signes cliniques moins sévères. La BMD est causée également par une mutation au niveau du gène de la dystrophine, mais cette dernière ne dérange pas le cadre de lecture et ne se traduit pas par un codon-stop. Ainsi, les patients atteints par la BMD sont donc capables de produire une protéine semi-fonctionnelle, appelée quasi-dystrophine, qui augmente considérablement la résistance des muscles [251, 260]. Ainsi, même si la dystrophine n'est pas parfaitement fonctionnelle, elle peut quand même accomplir partiellement son rôle, ce qui a une répercussion directe au niveau des signes cliniques présents [248].

2.7.2 La dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss

La dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (EDMD) a été longtemps confondue avec la dystrophie musculaire de Becker (BMD), ainsi qu'avec la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Ce n'est qu'en 1966 que deux chercheurs, Emery et Dreifuss, firent l'observation que certains patients développaient des cardiomyopathies dilatées, ce qui n'est généralement pas le cas pour les patients atteints par la DMD ou par la BMD [245]. Les patients souffrant de cette dystrophie associée à une cardiomyopathie présentaient également des rétractions musculaires localisées au niveau des coudes, des tendons d'Achille ainsi qu'au niveau la nuque [244]. Quoique très similaire entre-elles, l'EDMD se subdivise en trois sous-catégories différenciant le mode de transmission : autosomale dominant, autosomale récessif ou lié au chromosome X. Les formes dominantes et récessives sont dues à des mutations dans le gène codant pour la lamine A/C, une protéine se situant au niveau du noyau et de la lame basale [238]. Quant à elle, la forme liée au chromosome X est causée par une mutation au sein du gène codant pour l'émerine, une protéine nucléaire dont les fonctions sont encore mal connues [237].

2.7.3 La dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale

La dystrophie facio-scapulo-humérale (FSHD) est une myopathie à transmission autosomique dominante qui affecte autant les femmes que les hommes. Avec une prévalence se situant entre 1:15000 et 1:20000, c'est la troisième plus importante dystrophie après les dystrophinopathies et les dystrophies musculaires myotoniques [247]. Les mécanismes moléculaires de cette maladie sont encore mal compris, mais le problème semble être relié à une délétion du fragment D4Z4 au niveau du quatrième chromosome. Une personne normale possède entre 11 et 100 copies du fragment D4Z4, alors que 95% des personnes atteintes par cette myopathie possèdent au moins un allèle ayant entre une et dix copies de ce fragment [261]. Pour ce qui est des signes cliniques, ils sont assez diversifiés, allant des patients asymptomatiques aux patients rivaux à leur chaise roulante. La majorité des patients deviennent symptomatiques durant la vingtaine et le premier signe clinique est une faiblesse musculaire asymétrique du visage [263].

2.7.4 La dystrophie musculaire oculo-pharyngée

La dystrophie musculaire oculo-pharyngée (OPMD) est une myopathie à transmission autosomique dominante au même titre que la FSHD. Sa prévalence est excessivement variable et cette maladie est confinée au niveau génétique à quelques origines familiales. En Israël, son occurrence est de 1:600, au Québec elle est de 1:1000, tandis qu'ailleurs en Europe, elle se situe à 1:100000 [240, 246]. Les premiers symptômes apparaissent très tardivement dans la vie du patient, entre 40 et 60 ans, laissant le temps à cette personne de se reproduire expliquant du coup l'aspect familial de cette maladie [239]. Les premiers signes cliniques sont la ptôse palpébrale ainsi que la dysphagie, d'où elle tire son nom. L'OPMD est due à une anomalie du gène PABPN1, lequel est situé sur le chromosome 14. Au même titre que la maladie de Steiner, le problème est causé par la répétition d'un triplet qui empêche le bon fonctionnement de ce gène. Plus précisément, on retrouve entre huit et 13 copies du triplet GCC à la partie 5' du gène PABPN1 chez les patients atteints par cette myopathie, contrairement à seulement six chez les gens normaux [264].

2.7.5 Les dystrophies distales

Les dystrophies distales sont un groupe hétérogène de troubles génétiques, caractérisées par une atrophie musculaire progressive et une faiblesse musculaire se manifestant d'abord au niveau des mains, des jambes ou des pieds. La plupart sont des formes autosomiques dominantes, d'autres se transmettent selon le mode autosomique récessif [265]. Ce groupe de myopathies se compose actuellement de cinq maladies principales. La plus commune est la myopathie distale de Miyoshi, qui est causée par une déficience en dysferline. Les premiers signes, qui sont une myalgie ainsi qu'une intolérance à l'exercice physique, apparaissent entre 15 et 40 ans [258]. La mutation génétique de la myopathie de Miyoshi se situe sur le même gène que la LGMD2B et il n'est pas rare de voir les deux phénotypes au sein d'une même famille [252]. Parmi les autres dystrophies distales, il y a la myopathie distale de Nonaka, connue aussi sous le nom de HIBM pour « *Hereditary inclusion body myopathy* », qui est causée probablement par une mutation au niveau du gène de la GNE [243]. Il y a également la myopathie distale de Laing qui, contrairement aux autres dystrophies distales, survient très tôt dans la vie des gens atteints, soit à l'âge de quatre ou cinq ans [266, 267]. Finalement, il y a les myopathies distales de Welander et d'Udd qui apparaissent toutes deux entre 30 et 70 ans.

2.7.6 Les dystrophies musculaires congénitales

Les premiers cas de dystrophies musculaires congénitales (CMD) ont été décrits au début du 20^e siècle par Frederick E. Batten. Les CMD sont en fait des dystrophies présentes à la naissance causées par un trouble génétique menant à l'incapacité de produire certaines protéines [253]. Actuellement, 11 gènes ont été identifiés causant chacun plusieurs pathologies bien distinctes en fonction de la protéine pour laquelle ils codent [254]. La pathologie la plus commune des CMD, avec une prévalence de 30 à 40%, est la dystrophie musculaire congénitale mérosine négative (MDC1A). Les patients atteints par cette CMD ne sont pas capables de synthétiser la mérosine, aussi appelée laminine- α 2, qui se situe entre autre au niveau de la membrane basale. Sans la mérosine, les fibres musculaires ne peuvent s'attacher efficacement à la membrane basale, ce qui provoque le bris lors d'un effort [268, 269].

Parmi les autres CMD importantes, il y a le syndrome Walker-Warburg, qui est caractérisé par une espérance de vie de moins de trois ans, une hydrocéphalie et des anomalies oculaires [270]. Il y a aussi la myopathie d'Ullrich, causée par une mutation au niveau du gène codant pour le collagène de type 6. La myopathie d'Ullrich est, quant à elle, caractérisée par une longévité de plus de 20 ans, une intelligence normale, la faculté de marcher (rapidement perdue en très bas âge) et l'utilisation d'un respirateur au début de la vingtaine [250].

2.7.7 Les dystrophies musculaires myotoniques

Les dystrophies myotoniques (DM) sont considérées comme étant des maladies causées par une expansion anormale de répétition de séquences génétiques, *repeat expansion disorders* [241]. Actuellement, on dénombre deux types de DM nommées DM1 et DM2, mais d'autres sous-types comme la DM3, DM4 et la DMX sont fortement suspectées d'exister. La DM1, ou maladie de Steiner, est de loin la plus connue et encore plus au Québec à cause de sa prévalence de 1:530 dans la région du Saguenay/Lac St-Jean [259]. La DM1 est causée par une répétition anormale du trinuéclotide CTG situé dans la région 3' non-codante du gène DMPK codant pour la myotonine. Généralement, une personne possède entre cinq et 37 répétitions de ce trinuéclotide; chez les personnes atteintes, ce nombre peut atteindre quelques milliers [262]. Les acides ribonucléiques (ARN) messagers, qui sont porteurs de l'amplification, sont séquestrés au niveau du noyau et cette séquestration induit l'accumulation de certaines protéines : « CUG Binding proteins » et la « Muscle-blind-like » [255-257]. Ces protéines ont un effet cytotoxique en altérant l'épissage alternatif des ARN messagers codant pour d'autres protéines : le « chloride channel 1 » (CLCN1), le récepteur à l'insuline, la troponine cardiaque, la protéine Tau et la « Myotubularin-related protein 1 » (MTM1). Cela permet d'expliquer en partie la myotonie et certaines atteintes systémiques de la maladie de Steinert. La DM2, connue sous le nom de PROMM pour « proximal myotonic myopathy », s'explique de la même manière que la DM1, à l'exception que la répétition se trouve au niveau du gène de la ZNF9 [241].

2.7.8 Les dystrophies musculaires des ceintures

Communément appelée en anglais « *limb girdle muscular dystrophy* » (LGMD), ce type de dystrophie se manifeste principalement par une dégénérescence progressive de la force des muscles du bassin et des épaules. Actuellement, on dénombre sept formes de LGMD à transmission autosomale dominante, nommées de LGMD1A à LGMD1G, ainsi que 14 formes de LGMD à transmission autosomale récessive, nommées de LGMD2A à LGMD2N [236, 242, 249]. La prévalence totale des diverses LGMD est d'environ 1:200000 et la forme dominante compte pour moins de 10% des patients. Dans tous les cas, une mutation génétique empêche les protéines nécessaires au bon fonctionnement du muscle d'être présentes en assez grand nombre. Parmi ces dernières, on retrouve respectivement pour les formes dominantes 1A, 1B et 1C : la myotiline, la lamine A/C et la calvéoline. En ce qui concerne les formes récessives les plus connues, la calpaïne et la dysferline sont responsables des formes 2A et 2B, tandis que les sarcoglycans sont quant à eux responsables des formes 2C à 2F [249]. Étant donné que chaque type de LGMD est causé par une protéine différente, l'évolution des dystrophies des ceintures est très variable d'un type à l'autre. De plus, leur faible prévalence dans la population ne laisse que peu de cas à étudier.

Chapitre 3 : Transplantation et tolérance

Depuis toujours, l'idée de remplacer des organes humains non-fonctionnels, mutilés ou amputés est un concept qui a toujours fasciné autant la communauté médicale que la population en général (Figure 3-1). Évidemment, on a vite appris que le transfert d'organes est une procédure très fastidieuse car le système immunitaire va rejeter quasi systématiquement toutes greffes. C'est ici que deux choix s'offrent : une prise de médicaments immunosuppresseurs ou bien le développement de la tolérance immunologique. Pour ce qui est des immunosuppresseurs, ils sont très efficaces et couramment utilisés de manière permanentes pour la plupart des greffes. Une utilisation transitoire postopératoire est possible lorsque le greffon présente une histocompatibilité de 6/6 et que ce dernier n'introduit aucune nouvelle protéine chez l'hôte. Comme mentionné au deuxième chapitre, la thérapie cellulaire dans le cas de la DMD introduit la dystrophine chez les patients dystrophiques et une réaction immune est produite via une présentation antigénique du CMH de classe I. De plus, l'utilisation à long terme d'immunosuppresseurs dans le cas de greffes de myoblastes n'est pas vraiment une option envisageable étant donné leur toxicité quasi systémique. C'est ici qu'intervient le développement de tolérance immunologique, qui se définit comme étant une absence de réaction immunitaire envers le greffon chez un hôte immunocompétent.

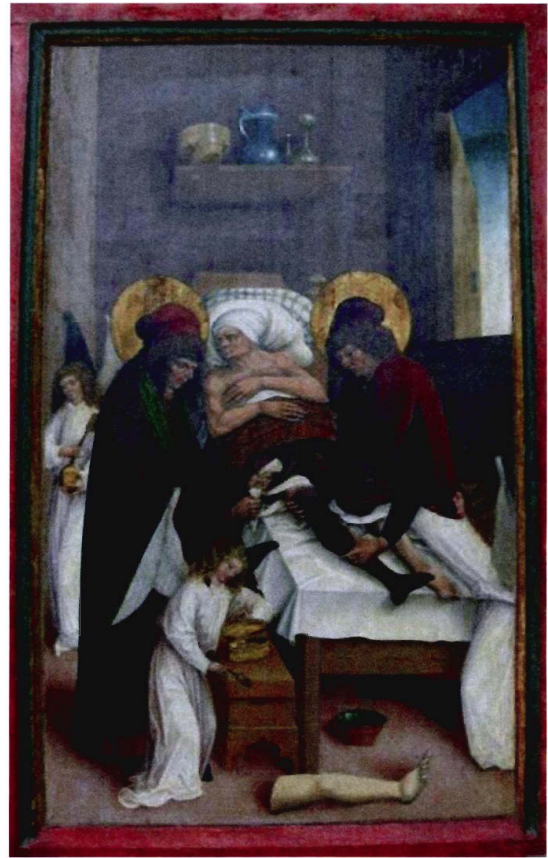


Figure 3-1: Fresque de Fra Angelico représentant la greffe d'une jambe au 3^e siècle Saint Côme et Saint Damien, assistés d'anges, remplaçant la jambe gangréneuse de Giustiniano par celle d'un éthiopien décédé. Collection du couvent de San Marco, Florence, Italie.

3.1 Les types de transplantation

Aussitôt que l'on retire une cellule, un bout de tissu ou un organe de son emplacement originel et qu'on le réimplante ailleurs, nous pouvons dire qu'il y a eu transplantation. Toutefois, tout dépendant des origines du donneur ainsi que de celles du receveur, on peut classer la transplantation dans l'une des quatre principales catégories suivantes [271].

3.1.1 L'autogreffe

L'autogreffe est la plus simple de toutes les greffes et consiste à déplacer le transplant d'un endroit à un autre sur le même individu. Par exemple, une chirurgie commune consiste à prélever de la peau au niveau des fesses ou des cuisses afin de la greffer à un endroit endommagé sur le corps. De plus, étant donné que le transplant provient du donneur, il n'y aura aucun rejet d'ordre immunitaire.

3.1.2 L'isogreffe

Lorsque le donneur et le receveur sont identiques génétiquement, on parle d'isogreffe. Par exemple, une greffe faite entre deux jumeaux identiques est une isogreffe. Les isogreffes sont cependant beaucoup plus courantes chez les animaux de laboratoire de souches congéniques. Pour ce qui est du rejet immun, il n'y en aura pas étant donné que leurs CMH sont identiques et qu'ils produisent exactement les mêmes protéines.

3.1.3 L'allogreffe

Aussitôt que le donneur et le receveur ne sont pas identiques du point de vue génétique, mais qu'ils appartiennent tous deux à la même espèce, il s'agit d'une allogreffe. En absence de médication, l'hôte va rejeter le transplant plus ou moins rapidement suite au polymorphisme retrouvé au niveau du CMH ainsi que celui retrouvé au niveau des antigènes mineurs.

3.1.4 La xénogreffe

Le dernier type de greffe, la xénogreffe, est celui qui est fait entre espèces différentes. Par exemple, la greffe de cœur de porc chez l'homme est très étudiée étant donné la disponibilité de la ressource première. Bien sûr, sans aucune médication, ce type de greffe est rejeté très rapidement.

3.2 Le rejet de greffe

Le rejet de greffe se produit aussitôt que les cellules implantées ne sont pas identiques du point de vue génétique. Étant donné que les cellules nouvellement implantées ne présentent pas le même CMH, une réponse immune de type cellulaire se déclenche chez l'hôte via les présentations de types directes et indirectes [272, 273]. Tout d'abord, la présentation directe est causée par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) du donneur présentes dans les tissus greffés. Ces cellules nouvellement implantées migreront aux organes lymphoïdes secondaires et activeront les lymphocytes T (LT) de type $CD4^+$ *helper* (T_H), reconnaissant soit le CMH du donneur, soit des peptides du donneur ou tout simplement les deux. Une fois activés, les T_H vont amplifier la réaction immunitaire de manière exponentielle jusqu'à épuisement des antigènes étrangers. Pour ce qui est de la présentation indirecte, elle est causée par l'exposition d'antigènes du donneur par les cellules présentatrices d'antigènes du receveur suite à la phagocytose de protéines allogéniques. Les T_H reconnaissant ces peptides vont alors être activés et déclencheront la réponse immune. Pour ce qui est du rejet, on le classe en trois catégories distinctes selon le type de réponse.

3.2.1 Le rejet hyper-aigu

Le rejet hyper-aigu, ou suraigu, est surtout causé par la reconnaissance d'anticorps circulants préformés. Cette fixation, survenant quelques minutes après la greffe, active le système du complément causant une forte réaction inflammatoire ainsi qu'un infarctus du greffon (Figure 3-2) [274, 275].

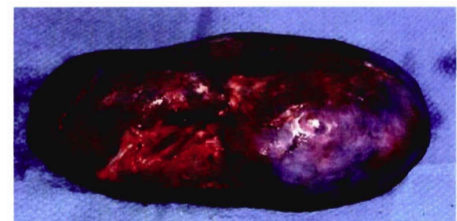


Figure 3-2: Rein infarci

Lors d'une xénogreffe, un infarctus se produit en moins de 15 minutes. Image tirée de Lévy 2007 [2].

3.2.2 Le rejet aigu

Le rejet aigu est le résultat d'une réponse cellulaire et humorale spécifique survenant environ sept jours après la greffe; laps de temps nécessaire à l'activation des LT. Sans aucune médication immunosuppressive, le processus de rejet aigu va mener indubitablement à la nécrose complète du transplant via les réponses cellulaires et humorales.

3.2.3 Le rejet chronique

Le rejet chronique se caractérise par une lente détérioration progressive et irréversible du greffon. Cette détérioration est principalement due à des « petites attaques » du système immun stimulées par des antigènes mineurs au niveau de l'organe greffé. Des lésions fibrosantes surviennent au niveau des vaisseaux sanguins de manière diffuse et circonférentielle. Le seul traitement contre le rejet chronique est une deuxième transplantation, mais il y a un risque accru de récidives.

3.3 Le GVHD

La maladie du greffon contre l'hôte (GVHD, Graft Versus Host Disease) est une complication fréquente et très grave des greffes allogéniques de moelle osseuse (BMT), ou de cellules souches hématopoïétiques. Le but de la BMT est de remplacer le système immunitaire du receveur par celui du donneur suite à une maladie telles les leucémies ou bien de restaurer ce système par une BMT autologue suite à une dose supra-létale d'irradiation [276]. Comme son nom l'indique, la GVHD est en fait une attaque par des cellules greffées immunocompétentes envers les cellules de l'hôte. Généralement, ce phénomène est produit lorsque des lymphocytes T (LT) matures contaminent la moelle osseuse avant la greffe. De plus, le système immun de l'hôte étant généralement détruit, il ne peut pas se défendre contre cette attaque, si minime soit-elle. L'administration d'immunosuppresseurs durant une courte période permet généralement d'éviter cette pathologie en détruisant ou tout simplement en provoquant l'anergie des LT potentiellement greffés [274].

3.4 L'immunosuppression

Les immunosuppresseurs visent à empêcher le système immunitaire, ou certaines de ses sous-divisions, à effectuer leur activité normale. Principalement, ces médicaments servent à traiter certaines maladies auto-immunes ou à prévenir le rejet de greffe ainsi que le GVHD. Quoique bénéfique dans plusieurs situations, il n'en demeure pas moins que ces drogues possèdent plusieurs effets secondaires très néfastes : certaines augmentent la prévalence du cancer [277], d'autres sont néphrotoxiques [278, 279], neurotoxiques [280, 281] ou hépatotoxiques [277], et ce sans compter que ces drogues ouvrent la porte à une pléiade d'infections opportunistes. Actuellement, des centaines de drogues ont des capacités immunorégulatrices et pour faciliter la classification, les immunosuppresseurs sont divisés en cinq groupes basés selon leur mécanisme d'action.

3.4.1 Les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont en fait un sous-type de corticostéroïdes modulant les métabolismes protidiques et glucidiques. Ils se fixent aux divers récepteurs cytosoliques des glucocorticoïdes (GR), appelés également NR3C1 pour « *nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1* », dont les plus connus sont les HSP90, HSP70 et la protéine de liaison au FK506 appelée FKBD52 [282]. Une fois liés à l'un de ces derniers, il y aura une trans-répression de plusieurs gènes dont l'IL-1, l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-8 ainsi qu'une trans-activation d'autres gènes [283, 284]. Leur potentiel immunosuppresseur passe principalement via la trans-répression de l'IL-2 qui est nécessaire à la prolifération des LT tout comme à l'expansion clonale des lymphocytes B (LB). Une utilisation à long terme de ce type de drogue peut provoquer le syndrome de Cushing, l'ostéoporose, une hyperglycémie, une insuffisance surrénalienne, une atrophie musculaire ainsi que des effets adverses sur le système nerveux central (SNC) [285]. Parmi les divers glucocorticoïdes actuellement utilisés, les plus connus sont le cortisol et ses dérivés, la prednisone et ses dérivés ainsi que les dérivés du méthasone.

3.4.2 Les cytostatiques

Les agents cytostatiques sont des drogues qui inhibent la division cellulaire en endommageant ou détruisant les cellules qui sont en division rapide. Ils sont principalement utilisés au niveau de la chimiothérapie pour tuer les cellules cancéreuses se divisant sans cesse. La principale classe des drogues cytostatiques est celle des agents alkylants, qui effectue ses effets cytostatiques via une interaction avec l'ADN. La plus connue est sans aucun doute la cyclophosphamide, un dérivé du gaz moutarde, qui crée des liaisons covalentes avec l'ADN [286-288]. Parmi les autres classes, il y a les anti-métabolites, dont fait partie le méthotrexate, qui interfèrent avec la synthèse des acides nucléiques et des protéines. Il y a également la classe des antibiotiques cytotoxiques parmi laquelle fait partie la mitomycine C [289, 290]. Chacune de ces drogues possèdent une panoplie d'effets secondaires lorsque prises à long terme, en plus des effets à court terme tels la perte de cheveux, la diarrhée, les vomissements, les nausées, les maux de tête, les brûlures d'estomac, etc. [291, 292]

3.4.3 Les anticorps

De par leur spécificité, les anticorps procurent une immunosuppression rapide et profonde, évitant ainsi le rejet aigu. Ce groupe se subdivise en deux catégories, soit les anticorps polyclonaux ainsi que les anticorps monoclonaux.

3.4.3.1 Les anticorps polyclonaux

Pour ce qui est des anticorps polyclonaux, ils sont obtenus via une réaction de thymocytes humains avec du sérum animal. Par exemple, le « *anti-thymocyte gamma globulin* » (ATGAM®), a été créé en injectant des thymocytes humains chez un cheval pour ainsi créer des anticorps de chevaux reconnaissant les lymphocytes humains [293-295]; la même chose a été faite chez le lapin pour créer la thymoglobuline [296-299]. Ainsi, en injectant par la suite ces anticorps chez un humain, ils vont activer le complément au niveau des LT chez le patient et ainsi réduire drastiquement leur nombre. Cependant, ils peuvent à l'occasion engendrer d'importantes réactions allergiques tout en ouvrant la porte aux infections opportunistes.

3.4.3.2 Les anticorps monoclonaux

En ce qui concerne les anticorps monoclonaux, ils sont dirigés contre des antigènes spécifiques, généralement le récepteur de l'IL-2 (CD25) ou bien le CD3. L'anti-CD3, un IgG de type 2a appelé commercialement OKT3[®], est un anticorps monoclonal de souris dirigé spécifiquement contre le complexe « *T-cell receptor* » (TCR)-CD3 réduisant à moins de 5% les lymphocytes circulants. Comme les anticorps polyclonaux, le système de l'hôte réagit rapidement contre ses parties constantes et quasi aucune trace n'est détectable après quelques semaines [300-302]. Contrairement à l'OKT3[®], les anticorps dirigés contre le CD25 ont été manipulés génétiquement afin d'éliminer les parties immunogéniques des anticorps. Bref, les généticiens n'ont conservé que la partie se liant à l'antigène, le « *complementarity determining region* » (CDR), ce qui permet aux anticorps de perdurer plusieurs mois dans l'organisme [303, 304]. Cependant, la prise à long terme de ce médicament pourrait potentiellement favoriser le développement de certaines maladies auto-immunes étant donné l'interaction avec le CD25, un récepteur naturellement exprimé sur les lymphocytes T régulateurs (Tregs) [305]. D'autres anticorps sont présentement à l'étude et pourraient, dans un avenir assez rapproché, être utilisés en clinique. Parmi ceux-ci, on compte l'anti-LFA-1, l'anti-CD45RB, l'anti-CD52, l'anti-CD80, l'anti-CD86 et l'anti-CD154 [306].

3.4.4 Les inhibiteurs de la calcineurine

Les inhibiteurs de la calcineurine, principalement le FK506 (Prograf[®], tacrolimus), la rapamycin et la cyclosporine, sont parmi les immunosuppresseurs les plus couramment utilisés. Leurs caractéristiques immunomodulatrices résident au niveau de leur capacité d'interaction avec la calcineurine. Cette protéine, connue également sous le nom de protéine phosphatase 2B (PP2B), a la capacité de réguler entre autre la synthèse de l'IL-2. Ainsi, en inhibant cette dernière, la croissance et la différenciation de LT ne peuvent s'accomplir et une tolérance est ainsi créée [307]. Encore une fois, plusieurs effets toxiques sont observables à long terme, dont une forte néphrotoxicité ainsi qu'une neurotoxicité [308].

3.4.5 Autres méthodes immunosuppressives

Une panoplie d'autres molécules peut agir au niveau du système immunitaire pour créer une certaine tolérance. Parmi ceux-ci, il y a les interférons, qui suppriment la production des cytokines provenant des Th1 [309]. Il y a également les opioïdes qui agissent tant au niveau du système immunitaire inné qu'adaptatif via les récepteurs aux opioïdes situés sur plusieurs cellules [310]. Il y a aussi les médicaments se liant au « *tumor necrosis factor α* » (TNF- α), dont le mieux connu est le Remicade[®], qui agissent via l'inhibition de synthèse de l'IL-1, de l'IL-6 ainsi que de certaines molécules d'adhésions lymphocytaires [311]. L'acide mycophénolique, dérivé actif du mycophénolate mofetil (MMF), peut également agir à titre d'immunosuppresseur via son profil d'inhibiteur non-compétitif, sélectif et réversible de l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH), un enzyme clé dans la synthèse de la guanosine, un nucléotide. En effet, les LB tout comme les LT sont des cellules qui sont très dépendantes de ce nucléotide et l'inhibition de ce dernier mène à leur destruction [312, 313]. Finalement, il y a le FTY720 qui réduit l'expression de certaines intégrines lymphocytaires, provoquant l'accumulation des lymphocytes au niveau des organes lymphoïdes secondaires [314, 315].

3.5 La tolérance immunologique

La tolérance immunologique se définit comme étant la capacité du corps à accepter un ou des antigènes étrangers de manière spécifique tout en restant fonctionnel à 100%. La majorité des immunologistes s'entendent pour dire que la tolérance immunologique est le Saint-Graal de l'immunité et les travaux de Medawar, Owen, Billingham ainsi que Brent ont marqué le commencement de cette quête au milieu du 20^e siècle [316-319]. Avec les années, deux types de tolérance ont été mis en évidence, soit la tolérance centrale ainsi que la tolérance périphérique. Plusieurs tentatives ont été tentées pour révolutionner le monde de l'immunologie, mais bien peu se sont rendues en essai clinique et aucune n'a été reconduite [320].

3.5.1 La tolérance centrale

La clef de voûte de la tolérance centrale réside au niveau de la sélection thymique. En effet, avant qu'un lymphocyte T (LT) patrouille le corps, il doit passer par deux étapes de sélection, qui se font au niveau du thymus, afin de s'assurer que ce LT ne réagisse pas au « soi » tout en étant capable de s'attaquer efficacement au « non-soi ». La première étape, la sélection positive, vise à s'assurer que ce lymphocyte puisse reconnaître des antigènes présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du soi. Pour ce faire, ils sont mis en contact avec des cellules épithéliales corticales et les lymphocytes n'ayant pas une assez forte affinité ne reçoivent pas le signal de survie et sont tout simplement éliminés. La deuxième étape, la sélection négative, vise quant à elle à s'assurer que les LT ne s'attaqueront pas aux cellules du « soi ». Pour ce faire, des antigènes du « soi » sont présentés par des cellules dendritiques (DC) au niveau de la médulla thymique et les clones réagissant trop fortement avec ces derniers sont soit éliminés, rendus anergiques ou bien transformés en Tregs [275]. La tolérance centrale vise donc principalement à faire exprimer les CMH au niveau des CD afin que tous les clones lymphocytaires réagissant contre ces derniers soient éliminés.

3.5.1.1 Le chimérisme hématopoïétique

Actuellement, un des moyens les plus efficaces pour établir une tolérance centrale est d'induire un chimérisme hématopoïétique, c'est-à-dire d'avoir à la fois dans le même organisme la moelle osseuse du receveur ainsi que celle du futur donneur. Étant donné que les cellules souches hématopoïétiques (HSC, Hematopoietic Stem Cell), cellules à l'origine de toutes les lignées de cellules sanguines, sont présentes dans la moelle osseuse, des DC du donneur seront produites à l'intérieur même du receveur. Ainsi, certaines d'entre elles migreront au thymus pour participer à la sélection lymphocytaire, éliminant du coup les LT ayant une trop forte affinité pour le CMH du donneur. Cependant, établir le chimérisme n'est pas facile étant donné la présence préalable de lymphocytes matures alloréactifs. Un autre problème est la quantité élevée de cellules souches hématopoïétiques requises.

3.5.1.2 La quantité de cellules requises

Le chimérisme hématopoïétique est calculé en pourcentage et se divise en trois principales catégories. Premièrement, on dit qu'il y a micro-chimérisme lorsque moins de 1% des cellules du système immunitaire sont celles du donneur. Il y a chimérisme partiel lorsque ce ratio se situe entre 1 et 99,9% et il y a chimérisme total lorsque le système immunitaire de l'hôte est uniquement composé des cellules du donneur. En ce qui concerne le micro-chimérisme, sa capacité à induire une tolérance immunologique envers une greffe n'est pas claire [321, 322]. Il y a deux principaux facteurs influençant le pourcentage du chimérisme qui sera obtenu: la quantité de cellules initialement injectées tout comme la disponibilité d'une niche au niveau de la moelle osseuse pour ces cellules. En effet, il a été clairement démontré qu'une myéloablation partielle favorise grandement la nidation des HSC [323, 324]. Une myéloablation partielle peut être obtenue par l'utilisation d'un agent alkylant comme le tréosulfan [1], le bulsulfan [325], la cyclophosphamide [326], le diméthyle de kycleran [327] ou la fludarabine [328]. La myéloablation peut également être induite via une irradiation partielle, mais même si cette dernière s'est démontrée efficace, son utilisation potentielle chez l'homme est très controversée [320, 329].

3.5.1.3 Les clones lymphocytaires matures alloréactifs

Avant d'injecter la moelle osseuse du donneur chez l'hôte, il faut s'assurer que tous les clones lymphocytaires potentiellement alloréactifs sont éliminés. Ceci peut être obtenu à l'aide d'anticorps cytotoxiques [330, 331], ou bien à l'aide d'un agent cytostatique, comme la cyclophosphamide, suite à une stimulation spécifique effectuée par une « *donor-specific transfusion* » (DST) [1]. Une irradiation thymique peut également être faite, mais encore une fois l'applicabilité à l'homme est douteuse [332]. C'est uniquement après la destruction ou l'anergie de tous les clones alloréactifs que la greffe de moelle osseuse (BMT, Bone Marrow Transplantation) peut être accomplie. C'est ici que se situe actuellement l'inconvénient de tous les protocoles de tolérance centrale : l'utilisation d'agents toxiques pour éliminer les clones alloréactifs.

3.5.1.4 Le TTCB

Le TTCB est un acronyme signifiant Transfusion, Tréosulfan, Cyclophosphamide et BMT, est un excellent exemple de protocole de tolérance centrale qui a également fait ses preuves au niveau de la greffe de myoblastes. Le principe de base de ce protocole est fort simple et consiste dans un premier temps à éliminer tous les clones alloréactifs. Pour ce faire, une transfusion de cellules du donneur (DST, Donneur Specific Transfusion) est faite, ce qui stimule fortement le système immunitaire de l'hôte. Ainsi, toutes les cellules alloréactives vont entrer en prolifération active. Par la suite, l'utilisation de la cyclophosphamide va provoquer

l'apoptose chez les cellules en prolifération, c'est-à-dire les cellules alloréactives. Pendant ce temps, le tréosulfan va créer une myéloablation partielle favorisant ainsi la nidation des HSC. Trente jours après la BMT, une première greffe de myoblastes allogéniques est faite et 100 jours après celle-ci, une deuxième greffe est effectuée afin de vérifier la stabilité dans le temps. Finalement, l'animal est sacrifié 100 jours après la seconde greffe et les *Tibialis antérieur* droit et gauche, endroits où ont eu lieu les greffes, sont prélevés et leur expression de dystrophine analysée. (Voir échelle du temps Figure 3-3). Ce protocole de tolérance immunologique a permis d'obtenir des résultats de greffe de myoblastes aussi bons qu'une immunosuppression soutenue avec le tacrolimus.

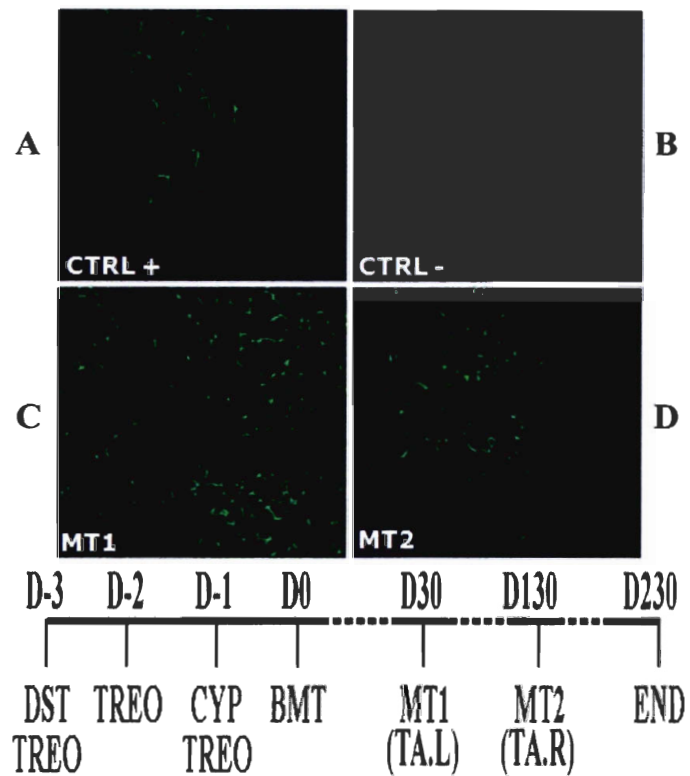


Figure 3-3: Résultats de greffes chez une souris MDX suite au TTCB

Greffe de myoblastes allogéniques chez une souris MDX A) immunosupprimées B) non-immunosupprimées C&D) non-immunosupprimées et tolérisées avec le TTCB. Image adaptée de Stephan 2006 [1].

MT : transplantation de myoblaste, TA : *Tibialis antérieur*, L : gauche, R : droite.

3.5.2 La tolérance périphérique

La tolérance périphérique est par définition une tolérance développée après que les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T aient mûri et entré dans la périphérie du corps. Ce mécanisme est très important parce qu'il est illusoire de penser que tous les antigènes du soi sont présentés au niveau thymique. En effet, il arrive à l'occasion que certains LT échappent à la sélection thymique négative. Ainsi, sans ces mécanismes de tolérance périphérique, la prévalence des maladies auto-immunes serait largement décuplée au sein de la population. Les mécanismes de tolérance périphérique ont été divisés en quatre groupes, dont le plus important est celui de la suppression par régulation négative [333].

3.5.2.1 L'ignorance

Le principe de base de l'ignorance repose au niveau de la séquestration des cellules du système immunitaire, c'est-à-dire que les alloantigènes ne viennent jamais en contact avec les cellules lymphocytaires. C'est principalement lors des greffes qui ne sont pas vascularisées, comme une greffe de cornée, que ce mécanisme de tolérance périphérique survient [334]. De plus, certaines régions sont dites immunoprotégées à cause de l'incapacité des cellules du système immunitaire à accéder à ces dernières comme, par exemple, les îlots de Langerhans [335].

3.5.2.2 L'anergie

L'anergie, également appelée la paralysie lymphocytaire, est une incapacité fonctionnelle des LT naïfs activés par un antigène à proliférer [336]. Pour qu'un LT prolifère, deux signaux sont nécessaires : celui produit par son TCR suite à la rencontre avec l'antigène, ainsi que celui produit via la costimulation. Il a déjà été démontré que le blocage des interactions CD80-CD86/CD28 [337, 338] ou CD154/CD40 [339] induisait une tolérance par anergie. Même si de manière générale le phénomène d'anergie survient lors de l'absence d'un des signaux de costimulation, certaines études ont démontré qu'une liaison de faible affinité avec le TCR pouvait également engendrer l'anergie [340].

3.5.2.3 La délétion clonale par apoptose

La délétion clonale par apoptose est un mécanisme naturel qui survient vers la fin d'une réaction immunitaire. Le principal but de cette délétion est d'éliminer le surplus de LT activés une fois la menace neutralisée. Cette délétion clonale peut se faire de manière passive via une privation ou un épuisement des facteurs de croissance tels l'IL-2, l'IL-4, l'IL-9, l'IL-15, l'IL-21. En effet, ces interleukines sont responsables de l'activation de divers facteurs anti-apoptotiques tels le Bcl-2 et le Bcl-xl [341]. En l'absence de ces derniers, l'apoptose est déclenchée via une signalisation intracellulaire. La délétion clonale par apoptose est également provoquée de manière active via la fixation de l'IL-2 à son récepteur, ce qui déclenche le phénomène de mort induite par l'activation cellulaire (AICD, *activation-induced cell death*) [342]. En effet, l'IL-2 engendre l'expression de CD178 (FasL) au niveau de la membrane cellulaire des lymphocytes qui, en se liant à CD95 (Fas), présent également sur la membrane, active la voie des caspases menant à l'apoptose [343].

3.5.2.4 La suppression par régulation négative

Le concept de régulation négative effectuée par une sous population lymphocytaire a été abordé sérieusement pour la première fois dans les années 1970. Ces cellules étaient alors appelées lymphocytes T suppresseurs, mais la recherche sur ces derniers a vite été abandonnée en l'absence de marqueurs moléculaires et cellulaires spécifiques [344]. Pendant près de 25 ans, ces cellules sont tombées dans l'oubli, et ce jusqu'à la découverte de l'équipe du Dr Sakaguchi. En effet, en 1995, le groupe japonais de Shimon Sakaguchi a décrit une sous population lymphocytaire de type CD4⁺, qui exprimait de manière constitutionnelle une forte densité de récepteurs à l'IL-2, le CD25, et qui avait la capacité de moduler des réactions auto-immunes : le retour de LT suppresseurs [345]. Cependant, avec la « redécouverte » de ces cellules, le nom « suppresseur », qui était à cette époque moins populaire, a été remplacé par celui de « régulateur », amenant du coup l'acronyme « Treg ». Depuis ce temps, les groupes de recherche travaillant avec les Tregs se sont multipliés de manière exponentielle et font de ces cellules un des sujets les plus chauds en immunologie depuis plus de 10 ans.

3.5.2.4.1 La caractérisation des Tregs

Les Tregs sont composés majoritairement de LT $CD4^+CD25^{high}$ exprimant le facteur de transcription « *forkhead box P3* » (FoxP3). Une foule d'autres marqueurs cellulaires non-spécifiques ont été découverts avec le temps comme le CD45RB, le CD62L, le CD103, le CD122, le CD134, le CTLA-4 et le GITR et peuvent servir au niveau de la caractérisation ainsi que de la sélection [346]. La manière spécifique dont ces Treg se développent naturellement dans le corps n'est pas entièrement élucidée. Cependant, tout porte à croire qu'ils se différencieraient des autres thymocytes au niveau du thymus via une affinité intermédiaire CMH/peptide avec les cellules corticales épithéliales lors de la sélection négative [347]. D'autres études suggèrent l'importance du rôle joué par certaines molécules de costimulation tout comme celui joué par certaines cytokines [348-351].

Plusieurs sous-types de Tregs ayant chacun un phénotype ainsi que des mécanismes d'action distincts ont été identifiés avec le temps : $CD8^+$, $TCR^+CD4^+CD8^+$, NK [352-354]. Cependant, on peut classer les Tregs dans deux principaux groupes : les Tregs natifs ou « *naturally occurring Tregs* », qui sont créés dans le thymus, ainsi que les Tregs induits. Ces Tregs induits sont produits lors d'une réaction immunitaire faisant intervenir des Tregs natifs. En effet,

lorsqu'un Treg natif se fixe à une CPA, il commence à sécréter de l'IL-10 ainsi que du TGF- β , deux cytokines anti-inflammatoires [355, 356]. Dans l'éventualité où un autre LT se fixerait à la même CPA, le contact entre le Treg natif et le LT, en synergie avec la présence de l'une de ces cytokines, transforme le LT en un sous-type de Tregs induits : Tr1 si la cytokine est l'IL-10 ou Th3 si la cytokine est le TGF- β (Figure 3-4).

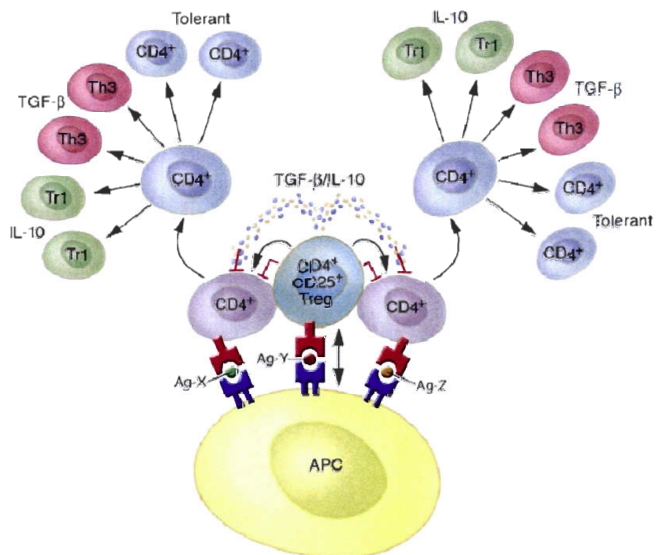


Figure 3-4: L'induction de Tregs
Image adaptée de Walsh 2004 [11].

3.5.2.4.2 Les Tregs *in vivo*

Il a été de nombreuses fois démontré qu'une thymectomie faite chez un souriceau de trois jours menait au développement de maladies auto-immunes multi-organiques et que ces pathologies pouvaient être prévenues par une injection de Tregs isolés à partir d'un autre souriceau [357]. C'est ainsi que le rôle au niveau de l'auto-immunité effectué par les Tregs natifs a été prouvé pour la première fois [345]. Bref, les Tregs sont un genre de mécanisme de sécurité *in vivo* corrigeant certaines erreurs commises au niveau de la sélection thymique. Au point de vue cellulaire, les Tregs sont capables d'inhiber l'action et l'expansion d'un grand nombre de cellules du système immunitaire incluant les LB [358], LT CD4⁺ [359], LT CD8⁺ [360], les NK [361], les NKT [362] ainsi que la maturation des cellules dendritiques [363]. De plus, leurs effets sur les LT ont été autant démontrés chez les clones mémoires que chez les LT naïfs [364, 365]. Les Tregs auraient également un rôle très important lors de la grossesse au niveau de la tolérance fœto-maternelle [366]. En effet, les antigènes communs entre la mère et le fœtus seraient une source de stimulation des Tregs qui outrepasserait la réaction immune envers les antigènes du père [367]. D'un côté moins intéressant, les Tregs sont capables d'induire une certaine tolérance envers les cellules tumorales, diminuant les chances du rejet normal des tumeurs [368, 369].

3.5.2.4.3 Le mécanisme d'action des Tregs

L'activation des Tregs se fait de manière spécifique à l'antigène tant *in vivo* qu'*in vitro* [355, 370, 371]. Pour ce qui est de la phase effective, elle est encore une fois spécifique à l'antigène *in vivo*, mais elle serait indépendante de ce dernier *in vitro* [372]. Le contact cellulaire est essentiel afin que les Tregs exercent leurs fonctions immunorégulatrices, laissant présager l'importance de plusieurs récepteurs [373]. Parmi ceux-ci, il a été prouvé que le CTLA-4 joue un rôle crucial; son expression est régulée positivement lorsque les Tregs sont stimulés [374] et il est capable d'interagir avec les récepteurs CD80 et CD86 des APC, produisant un signal de costimulation [375]. Certaines études démontrent également que cette interaction pourrait déclencher la suppression via l'induction de l'enzyme indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) [376]. Cette enzyme favorise la création de nouveaux Tregs via la conversion du tryptophane en kynurenine ainsi que d'autres métabolites.

Les Tregs pourraient également avoir certains effets cytotoxiques directs. Par exemple, il a été démontré que les Tregs pouvaient relâcher de la perforine ainsi que du granzyme A, pouvant ainsi détruire des LT, des LB et des monocytes [377]; cette destruction se ferait tant d'une manière dépendante qu'indépendante à la perforine. Cependant, à lui seul, ce mécanisme n'est pas suffisant pour expliquer la tolérance induite par les Tregs [375].

3.5.2.4.4 Les usages thérapeutiques des Tregs

Au niveau médical, les Tregs peuvent être utilisés dans une foule de situations diverses et ainsi atténuer, voir guérir, une foule de pathologies via leur pouvoir immunosuppresseur. Ils peuvent également être incorporés directement ou indirectement au sein de protocoles de tolérance immunitaire afin de réduire l'utilisation de diverses drogues toxiques. Plus précisément, il a été de nombreuses fois démontré que le transfert de Tregs spécifiques aux antigènes du greffon mène à une acceptation à long terme de ce dernier [346, 378, 379]. Dans un autre ordre d'idées, des études sur des modèles animaux suggèrent que certaines maladies auto-immunes induites par des LT CD4⁺ pourraient éventuellement être guéries par un transfert de Tregs [374] et le GVHD, quant à lui, peut être réduit de manière significative [380-382]. Le pouvoir immunosuppresseur de ces cellules peut également s'avérer très utile au niveau des allergies et de l'asthme [383-388]. À l'inverse, une déplétion de Tregs pourrait être utilisée pour guérir certains types de cancer étant donné leur rôle au niveau de l'immunité tumorale [389-392]. De plus, la présence d'un haut taux de Tregs a été détectée chez des patients souffrant de maladies pulmonaires obstructives chroniques [393] ou souffrant d'hypertension artérielle pulmonaire idiopathique [394, 395].

Chapitre 4 : L'utilisation des lymphocytes T régulateurs

4.1 Problématique

Depuis quelques années, plusieurs protocoles de tolérance immunologiques ont été développés, mais aucun d'entre eux n'est sans effet secondaire pour le patient. Il y a quelques années, le Dr Stéphan a développé dans nos laboratoires un protocole de tolérance centrale avant-gardiste : le TTCB. Ce protocole, utilisant uniquement des drogues approuvées pour une utilisation chez l'homme, fonctionne à merveille chez les souris et il est en cour d'optimisation chez le chien et le singe. Cependant, le TTCB comporte encore son lot d'effets indésirables causés par la toxicité de certaines drogues utilisées, principalement la cyclophosphamide (Voir la section 3.5.1.4 Le TTCB).

Le but de ces présents travaux est donc de réduire la toxicité de ce protocole, en remplaçant les drogues les plus toxiques par une simple injection de Tregs multipliés spécifiquement *in vitro*. Jusqu'à maintenant, nous avons été capables d'optimiser des protocoles afin d'isoler les lymphocytes T régulateurs, de les caractériser et de prouver leur potentiel d'inhibition. Ainsi, la pureté initiale des Tregs utilisés est d'environ 92% et l'expression du FoxP3, élément caractéristique des Tregs, a été démontré de deux façons distinctes. De plus, leurs fonctions immunorégulatrices ont été démontrées *in vitro* via une diminution d'une prolifération lymphocytaire stimulée artificiellement.

Pour compléter les travaux de cette étude et dans le but d'effectuer des premiers tests de tolérance, certaines expériences restent à être effectuées. Tout d'abord, il faut mettre au point le protocole de multiplication cellulaire *in vitro*. Par la suite, il faudra tester à nouveau les effets immunosuppressants des Tregs, en s'assurant de la spécificité de ces réactions. Finalement, il va falloir les incorporer au TTCB, en remplacement de la cyclophosphamide et de la DST chez divers modèles animaux. Par la suite, les premières greffes de myoblastes pourront être effectuées pour confirmer le tout.

4.2 Introduction

Le système immunitaire est parmi les éléments les plus complexes du corps humain. En effet, une myriade d'interactions cellulaires tant directes qu'indirectes se produit à la grandeur du corps et la majorité des mécanismes sous-jacents à ces interactions sont encore à découvrir. De plus, chaque année, de nouvelles cellules présentant un profil bien distinct de récepteurs sont découvertes et de nouvelles fonctions sont attribuées aux cellules déjà bien connues. Parmi ces cellules, les cellules T régulatrices sont en avant-plan depuis quelques années et la communauté scientifique ne cesse de découvrir de nouvelles sortes de cellules régulatrices [396, 397]. Comme mentionné au chapitre 3, leurs fonctions immunorégulatrices ne font plus aucun doute et nous sommes très près d'une utilisation thérapeutique à grande échelle. Cependant, prétendre être capable de moduler efficacement le système immunitaire serait excessivement prétentieux venant de quiconque, même des plus grands chercheurs actuels. Ainsi, c'est en toute humilité que ces travaux de manipulations du système immunitaire sont présentés.

4.3 Matériel et méthodes

4.3.1 L'isolation des Tregs

L'isolation des Tregs est faite par « *magnetic affinity cell sorting* », communément appelée MACS, à partir de rates de souris MDX. Tout d'abord, les souris sont sacrifiées selon les protocoles standards de l'animalerie et leurs rates sont récoltées de manière stérile. Par la suite, les rates sont placées dans 300 µl de tampon isotonique de type HBSS (*Hank's balanced salt solution*) avant d'être broyées à l'aide d'un pilon et d'un mortier afin d'obtenir une suspension tissulaire. Cette suspension est ensuite épurée à l'aide d'un filtre à pores de 50 microns et les cellules sont concentrées par 10 minutes de centrifugation à une vitesse de rotation fournissant une force équivalente à 300 G. À cette étape, un culot de cellules détachées de leur matrice et exempt de tissus conjonctif est obtenu. Par après, les cellules sont incubées avec un cocktail d'anticorps permettant un enrichissement en cellules CD4 positives.

Plus précisément, les anticorps se fixent à l'un des récepteurs suivant : le CD8 (Ly-2), le CD11b (Mac-1), le CD45R (B220), le CD49b (DX5) ainsi que le Ter-119. Il est à noter que tous ces anticorps sont couplés à la biotine, un complexe facilement reconnaissable par la streptavidine. Une fois l'incubation terminée, les anticorps excédentaires sont enlevés lors d'un lavage et les cellules couplées à l'anticorps primaire sont remis en suspension dans un tampon isotonique. Par la suite, un anticorps ayant d'un côté la streptavidine et de l'autre une microbille est ajoutée à la suspension liant indirectement la microbille à toutes les cellules ayant reconnu un des anticorps primaires. Une fois ce montage effectué, les cellules sont lavées une autre fois et passées au travers d'une colonne située dans un champ magnétique. Étant donné que les anticorps primaires reconnaissent des récepteurs qui ne sont pas exprimés par les cellules CD4 positives, les cellules qui sont retenues dans le champ magnétique sont uniquement CD4 négatives.

La fraction positive, celle ayant passé au travers la colonne, est concentrée à nouveau par centrifugation et incubée cette fois avec un anticorps reconnaissant le CD25 couplé à la phycoérythrine (PE). Suite à un lavage, un anticorps microbille-anti-PE est introduit fixant ainsi une microbille sur les cellules exprimant le CD25. Après un autre lavage, les cellules sont passées au travers d'une autre colonne située dans un champ magnétique. Ainsi, parmi les cellules enrichies en CD4, les cellules exprimant le CD25 sont donc sélectionnées. Finalement, la colonne est retirée du champ magnétique et les cellules sont lavées une dernière fois. La majorité de cette étape est effectuée à l'aide du « *CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit, mouse* » (130-091-041) produit par Miltenyi Biotec qui fournit également des informations supplémentaires avec la feuille de données accompagnant le produit (voir annexe 1).

4.3.2 La caractérisation des Tregs

Afin de s'assurer que les cellules récoltées sont bel et bien des Tregs et que le taux de pureté de la fraction CD4⁺CD25⁺ est assez élevé, deux analyses complémentaires peuvent être utilisées.

4.3.2.1 L'immunobuvardage

Une fois les cellules purifiées, la première chose à faire est de confirmer l'expression de la protéine FoxP3 au sein des cellules des fractions CD4⁺CD25⁺ et CD4⁺CD25⁻. Pour ce faire, les protéines sont extraites des cellules selon un protocole d'extraction protéique classique et elles sont dosées selon courbe étalon de BSA. Par la suite, chaque échantillon protéique est chargé sur un gel de polyacrylamide qui est placé sous un courant électrique forçant une migration des protéines au travers du gel, et ce en fonction de son poids. Par la suite, le gel est incubé avec un anticorps se liant au FoxP3 et permettant une liaison subséquente à un autre anticorps utilisé pour une détection par chimioluminescence. Suite à une exposition sur un film photosensible, une bande à 49 kDa caractérise l'expression du FoxP3 [398-400]. Pour cette expérience, le clone FJK-16S provenant d'eBioscience a été utilisé comme anticorps primaire. Un premier contrôle positif est des cellules 293T infectées *in vitro* par un lentivirus codant pour le FoxP3. Un autre contrôle, acheté chez Abcam (ab15736), a servi à confirmer le tout. Le contrôle négatif, quant à lui, provenait d'un extrait protéique effectué sur des myoblastes de souris MDX.

4.3.2.2 La cytométrie en flux

Afin de s'assurer du bon déroulement de chaque étape de la sélection ainsi que de la qualité de la fraction CD4⁺CD25⁺, les cellules doivent être analysées par cytométrie en flux, communément désigné par l'acronyme FACS pour « *Fluorescence Activated Cell Sorting* ». Ainsi, un échantillon de chaque fraction est mis de côté lors de la sélection et préparé pour cette analyse. Pour ce faire, les cellules sont incubées avec deux anticorps : le CD25 couplé au PE ainsi que le CD4 couplé au PE-CY5. Avec les contrôles appropriés, on peut distinguer ainsi les cellules doubles négatives, n'ayant fixés aucun anticorps, les cellules simples positives, ayant fixés soit le CD25 ou soit le CD4, et les cellules doubles positives, ayant fixés les deux anticorps et qui sont en fait nos fameux lymphocytes T régulateurs.

4.3.3 Le potentiel d'inhibition des Tregs

Une fois les Tregs isolés, il faut confirmer leur capacité à inhiber l'activité normale des autres cellules du système immunitaire. Pour ce faire, une réaction lymphocytaire croisée, fréquemment appelée MLR pour « *mixed lymphocytes reaction* », est effectuée. Cette expérience consiste à stimuler des lymphocytes T $CD4^+CD25^-$, en l'occurrence la fraction n'ayant pas été sélectionnée lors du deuxième passage dans la colonne magnétique, et à vérifier si l'ajout de Tregs, dans différents ratios, réduit leur prolifération.

4.3.3.1 Le marquage au CFSE

La méthode utilisée pour suivre l'évolution de la prolifération est celle du CFSE (*carboxy fluorescein succinimidyl ester*). Le CFSE est une molécule qui se diffuse passivement à l'intérieur des cellules avant que ses groupes acétates ne soient clivés par les estérases intracellulaires. Une fois clivée, la molécule devient très fluorescente sous une excitation de 492 nm pour émettre à 517 nm. Pour ce qui est du marquage, les cellules $CD4^+CD25^-$ sont placées dans une solution de PBS à une concentration de 6 millions de cellules par ml en présence de 0,5 mM de CFSE. Ce marquage se fait à 37°C durant 15 minutes et il est succédé par trois lavages de PBS/BSA 0,1% à 4°C. Pour cette expérience, le CFSE utilisé provient de Molecular Probes™ sous le nom de *CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit* (C34554). Une fois les cellules marquées, suivre l'évolution de leur prolifération est très facile. En effet, la quantité initiale de CFSE intracellulaire étant constante, elle sera divisée par deux à chaque fois que la cellule se divise par mitose. Ainsi, une série de pics ayant chacun la moitié de la valeur de l'autre sont observables au fur et à mesure que l'expérience se déroule (Figure 4-1).

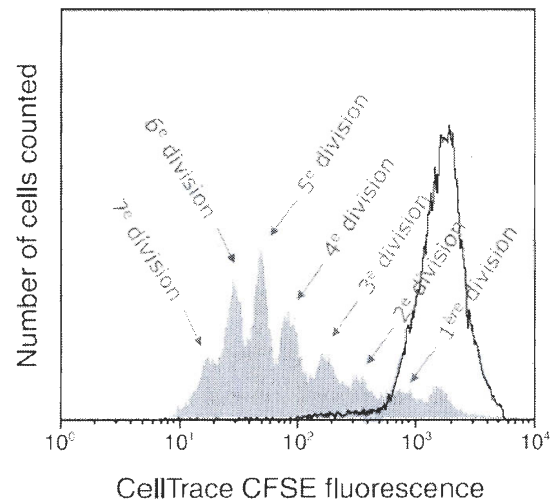


Figure 4-1: Marquage au CFSE

Lorsqu'une cellule-mère marquée au CFSE se divise, ses deux cellules-filles possèdent chacune deux fois moins de marquage. Image adaptée de Molecular Probe 2005 [3].

4.3.3.2 La sélection post-marquage

Même si une fois diffusé dans la cellule le CFSE n'est pas supposé en ressortir, il y a une fuite très significative et très variable entre les cellules dans les premières 12 heures (Voir la figure 4-4). Ainsi, les cellules ayant la quantité de CFSE résiduelle la moins élevée après 12 heures ont moins que la moitié du marquage des cellules ayant le plus de CFSE. Par conséquent, il sera impossible de dire si les cellules ayant une intensité faible de marquage sont des cellules qui avaient initialement une quantité plus grande de CFSE et qui se sont divisées ou si elles sont tout simplement des cellules ayant plus diffusées le CFSE. Pour corriger cette situation, les cellules fraîchement marquées au CFSE sont mises en culture durant 24 heures. Par la suite, toutes les cellules sont passées dans un FACS et des sous-groupes de cellules ayant une intensité de marquage similaire sont sélectionnés juste avant le début de l'expérience. Grâce à cette sélection, il est possible de déceler efficacement les cellules qui se sont divisées d'une à six fois lors de l'expérience.

4.3.3.3 La stimulation

De nombreuses méthodes de stimulation lymphocytaire sont possibles afin de vérifier l'inhibition des Tregs. Dans ces présents travaux, le milieu de culture cellulaire utilisé est supplémenté de « *phorbol 12-myristate 13-acetate* » (PMA) dans une concentration de 50 ng/ml en complément de 1 μ M d'ionomycine. Ces molécules activent la voie de la protéine kinase C (PKC) chez les cellules CD4⁺CD25⁻. L'indice de prolifération a par été calculé en fonction du ratio cellules-mères/cellules-filles tel que décrit dans le tutoriel du programme Flowjo, Flow Cytometry Analysis Software [401].

4.3.3.4 La culture

Toutes les cellules sont cultivées dans du RPMI 1640 supplémenté de 1% de pyruvate de sodium, 1% d'acides aminées non-essentiels, 10% de sérum foetal de bœuf décomplémenté (FBS, *fetal bovine serum*), 100 U/ml de pénicilline, 100 μ g/ml de streptomycine et de 50 μ M de 2 β -mercaptoéthanol. Les cellules sont par la suite disposées dans un des puits d'une plaque de 96 puits à fond rond et placées dans un incubateur à 37°C, à atmosphère humide et à 5% de CO₂.

4.4 Résultats

4.4.1 L'isolation des Tregs

Une fois prélevée, broyée, filtrée et lavée, la rate se compose majoritairement de globules rouges qui, étant négatifs pour le CD4 et le CD25, font augmenter le pourcentage de la fraction double négative à plus de 97% (Figure 4-2A). À ce point, le pourcentage de Tregs n'est que d'environ 0,3%. Suite à l'enrichissement en cellules CD4 positives (73% de cellules positive), le pourcentage de cellules $CD4^+CD25^+$ grimpe aux alentours de 8,7% dans la fraction enrichie (Figure 4-2C). Il est à noter qu'avec une déplétion préalable des globules rouges, ce taux grimpe aux environs de 10% (résultats non-présentés). Ce phénomène s'explique par le simple fait que certains globules rouges peuvent ne pas avoir fixés le Ter-119 lors de la première incubation. Ainsi, ces cellules ne fixent pas la microbille et passent au travers de la colonne lors du premier tri cellulaire. Cependant, ces cellules vont être éliminées lors de la deuxième sélection, n'affectant aucunement la pureté finale des Tregs. Ainsi, afin d'éviter un stress supplémentaire aux cellules, aucune étape de sélection par gradient de densité ou par chlorure d'ammonium n'est effectuée pour éliminer ces fameux globules rouges. En ce qui concerne la fraction négative du premier tri, celle attirée magnétiquement dans la colonne, elle est très majoritairement composée de globules rouges et elle est à 99% composée de cellules doubles négatives (Figure 4-2B).

Après la deuxième sélection, le pourcentage de Tregs s'élève désormais à environ 92% dans la fraction positive (Figure 4-2D), tandis que dans la fraction négative, il est d'environ 3% (Figure 4-2E). Par abus de langage, nous employons le terme $CD4^+CD25^+$, mais le terme exact devrait être $CD4^+CD25^{high}$. Ainsi, le pourcentage exact de Tregs ne peut être obtenu qu'en faisant en marquage intracellulaire au FoxP3. Cependant, en tronquant légèrement la queue inférieure de la distribution cellulaire, nous nous rapprochons du taux réel (Figure 4-2D).

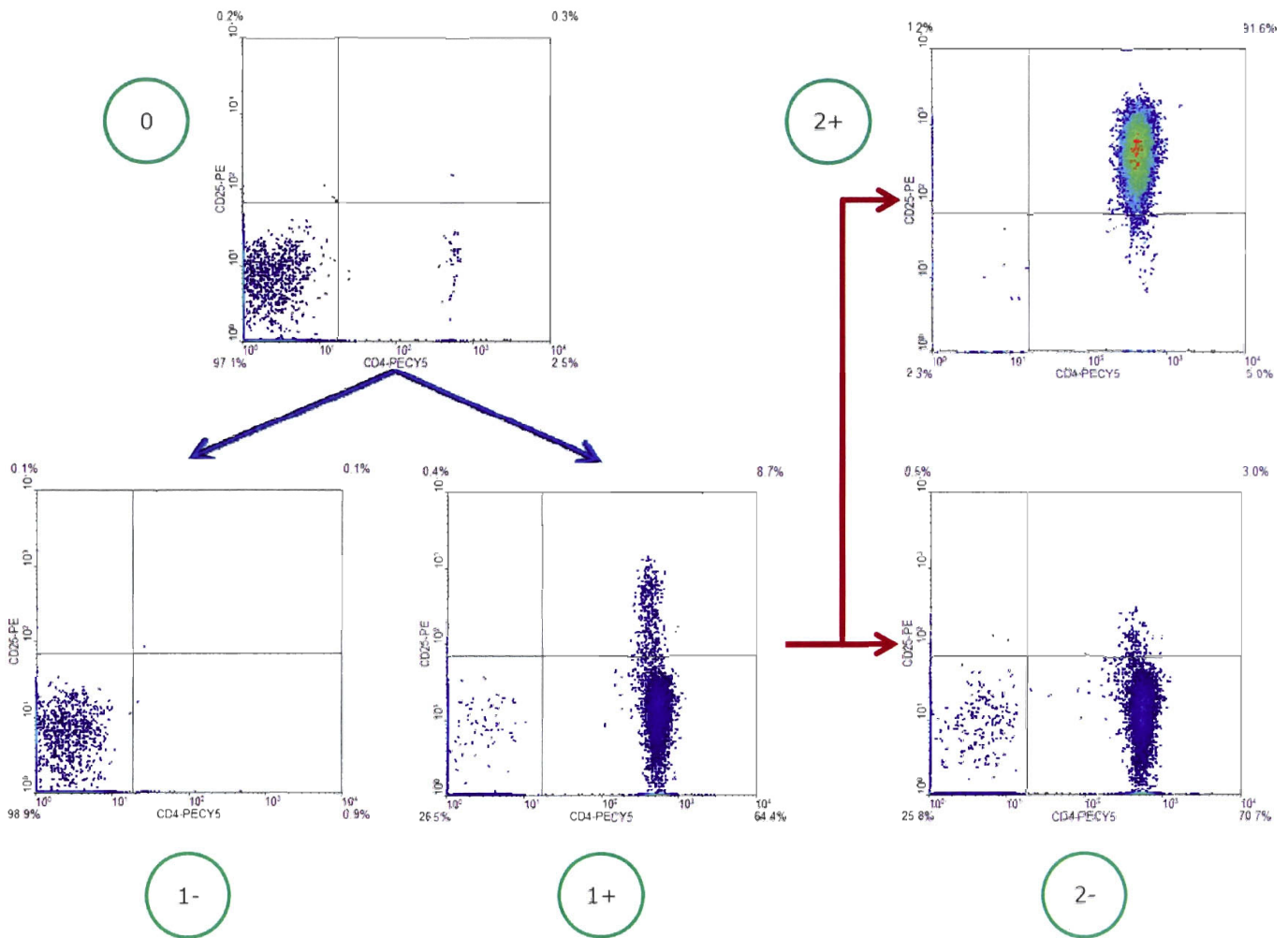


Figure 4-2: Évolution du marquage CD4/CD25 lors de la sélection par MACS

La sélection des Tregs se passe en deux étapes : un enrichissement en cellules CD4 positives, suivi d'une sélection pour le CD25.

0) Cellules fraîchement isolées : Les Tregs ne comptent que pour 0,3% des cellules isolés d'une rate.

1-) Fraction 1 négative : La majorité des cellules éliminées lors du premier tri sont des globules rouges.

1+) Fraction 1 positive : Suite à la première sélection, la suspension cellulaire est désormais CD4 positive à plus de 73%, avec plus ou moins 9% de Tregs.

2+) Fraction 2 positive : Après la deuxième sélection, le taux final de Tregs s'élève aux environs de 92% dans la fraction positive.

2-) fraction négative 2 : La fraction négative est composée de cellule CD4 positive à environ 75%.

4.4.2 La caractérisation des Tregs

Étant donné que c'est par les marqueurs CD4 et CD25 que les Tregs sont purifiés, il est évidemment impossible d'utiliser leur expression afin de caractériser les Tregs fraîchement isolés. De plus, une fois activés, les LT CD4 commencent à exprimer le récepteur à l'IL-2, soit le CD25, ce qui pourrait fausser les résultats en sélectionnant des cellules n'exprimant pas le FoxP3. Ainsi, pour enlever toutes ambiguïtés sur l'origine des cellules et pour s'assurer de l'efficacité de la deuxième sélection, un immunobuvardage contre le FoxP3 a été effectué sur les fractions positives et négatives de la deuxième sélection (Figure 4-3). Cette figure démontre clairement que l'expression du FoxP3, 49 et 52 kDa, se situe uniquement au niveau de la fraction CD4 et CD25 positive tout comme au niveau des différents contrôles positifs. Il est à noter que la quantité de FoxP3 est beaucoup plus grande au niveau des cellules du contrôle positif nommé Lenti, car le promoteur physiologique de ce dernier a été remplacé par un promoteur fort de cytomégalo virus (CMV) augmentant exponentiellement son expression intracellulaire.

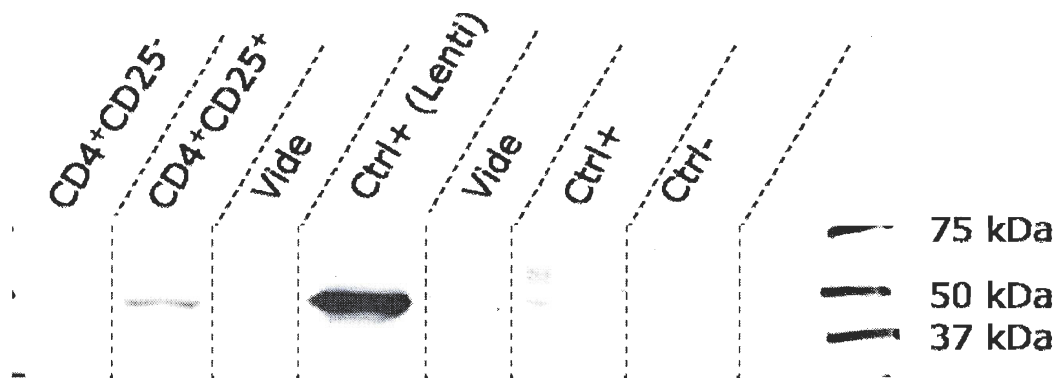


Figure 4-3: Immunobuvardage contre le FoxP3

La protéine FoxP3 possède deux bandes lorsqu'elle est détectée par immunobuvardage. La principale se situe à 49 kDa et la seconde, une forme repliée du FoxP3, se situe à 52 kDa. Cette photo d'un immunobuvardage contre le FoxP3 démontre clairement que nos cellules sont FoxP3 positives et qu'il n'y a aucune perte au niveau de la fraction négative. De plus, en regardant les différents contrôles, on s'aperçoit que notre anticorps est spécifique à cette protéine.

4.4.3 Le potentiel d'inhibition des Tregs

4.4.3.1 La diffusion du CFSE dans les 24 premières heures

Même si des indications contraires sont fournies par la compagnie produisant le CFSE, un important écoulement extracellulaire de CFSE survient inévitablement dans les 24 premières heures suivant le marquage. Pour savoir dans quelle proportion et pour avoir une meilleure idée du patron de diffusion, 24 échantillons identiques ont été marqués au CFSE et une analyse par FACS a été effectuée à chaque heure, durant 24 heures (Figure 4-4). Il est à noter qu'étant donné que le FACS doit être manipulé uniquement par le technicien responsable, il était impossible d'effectuer 24 analyses consécutives à chaque heure. Ainsi, les 24 échantillons ont été divisés en trois groupes pour qu'ils soient tous analysés en même temps, durant les heures ouvrables. Le premier groupe est marqué au temps 0, le deuxième est marqué au temps -8 et le troisième est marqué au temps -16. En faisant donc une analyse au temps 0, les résultats 0, 8 et 16 sont obtenus, au temps 1, les résultats 1, 9 et 17 sont obtenus et ainsi de suite. Étant donné la chute rapide du marquage dans les premières heures, l'écart entre la septième et la huitième heure pourrait s'expliquer par une différence de quelques minutes entre le marquage au temps -8 et celui au temps 0.

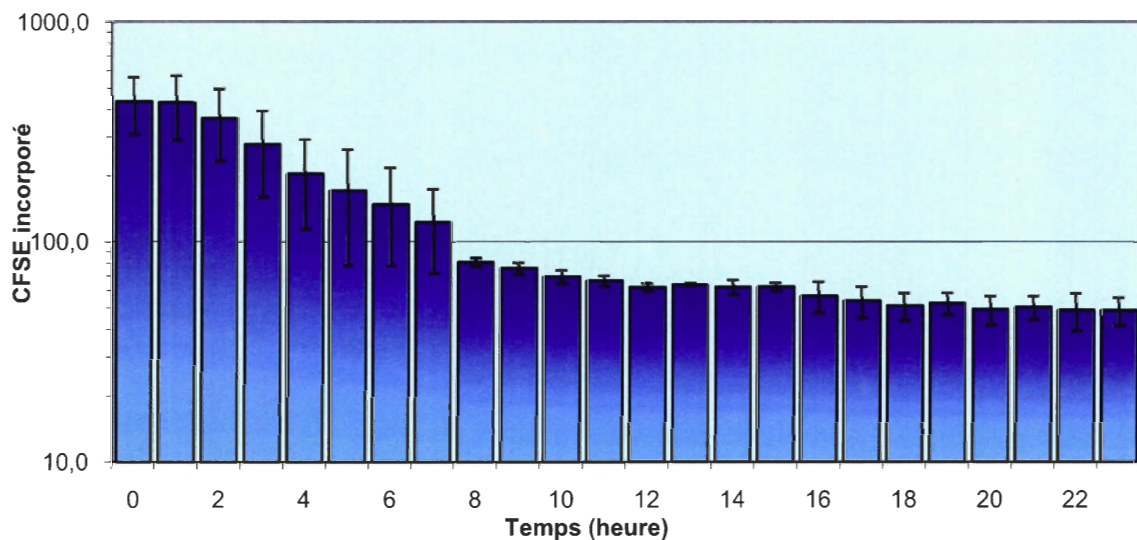


Figure 4-4: Patron de diffusion du CFSE dans les 24 premières heures

Les huit heures suivant le marquage démontrent un écoulement de plus de 80% du marquage ainsi qu'une grande variabilité. Après cette période cruciale, la diminution en marquage est minimale.

Cette expérience démontre clairement que dans les huit premières heures, l'intensité du marquage diminue de 80%. Par la suite, il y a certes une diminution, mais elle n'est pas vraiment significative. À partir de ces résultats, il a été décidé de toujours placer les cellules fraîchement marquées au repos pour une période de 16 à 20 heures. Par la suite, une sélection finale par cytométrie est effectuée en fonction de la quantité de CFSE résiduelle. Ainsi, la résolution du marquage est beaucoup plus grande, ce qui permet d'observer facilement jusqu'à six divisions cellulaires lors des diverses expériences.

4.4.3.2 L'effet des Tregs

Évidemment, l'immunobuvardage contre le FoxP3 nous indique qu'il n'y a pas de cellules FoxP3 positives au sein de notre fraction $CD4^+CD25^-$. Toutefois, il est possible que certaines cellules FoxP3 négatives se soient glissées dans la fraction positive et ces dernières ne seraient pas décelables par immunobuvardage. Si leur nombre est significatif, ces cellules pourraient nuire à l'effet immunorégulateur des Tregs. Ainsi, il est crucial de vérifier si les Tregs isolés sont capables de réduire la prolifération des cellules du système immunitaire. De plus, il faut savoir qu'elle est la proportion minimale de Tregs versus les $LT CD4^+$ nécessaire afin de voir les premiers effets immunorégulateurs et qu'elle est la proportion optimale. Ces données serviront par la suite à un premier ajustement des doses physiologiques de Tregs nécessaires pour créer une tolérance.

La figure 4-5 démontre clairement que l'ajout des Tregs fraîchement isolés dans un ratio 1:4 ralentit de manière significative la prolifération de $LT CD4^+$, et ce malgré une très forte stimulation via la voie de la PKC. Au sixième jour, l'indice de prolifération des puits contenant les Tregs est d'environ la moitié de celui des cellules $CD4$ seules stimulées à la PMA/ionomycine. Ces observations laissent donc envisager qu'une stimulation d'ordre physiologique, par les CPA par exemple, donc beaucoup moins forte, pourrait être inhibée presque entièrement par nos cellules. Cette affirmation reste à confirmer par le biais d'expériences, mais elle est en parfaite concordance avec les données recueillies par d'autres équipes; c'est-à-dire une inhibition de la prolifération quasi-totale jusqu'à un ratio de 1:8 [397, 402].

De plus, la figure 4-5A nous démontre clairement que la diffusion du CFSE est très faible tout au long de l'expérience et que la méthode de re-sélection par cytométrie en flux fonctionne efficacement. Plus précisément, le marquage moyen des cellules CD4 seules non-stimulées diminue d'environ 10% par jour, ce qui est minime une fois reporté sur une échelle logarithmique.

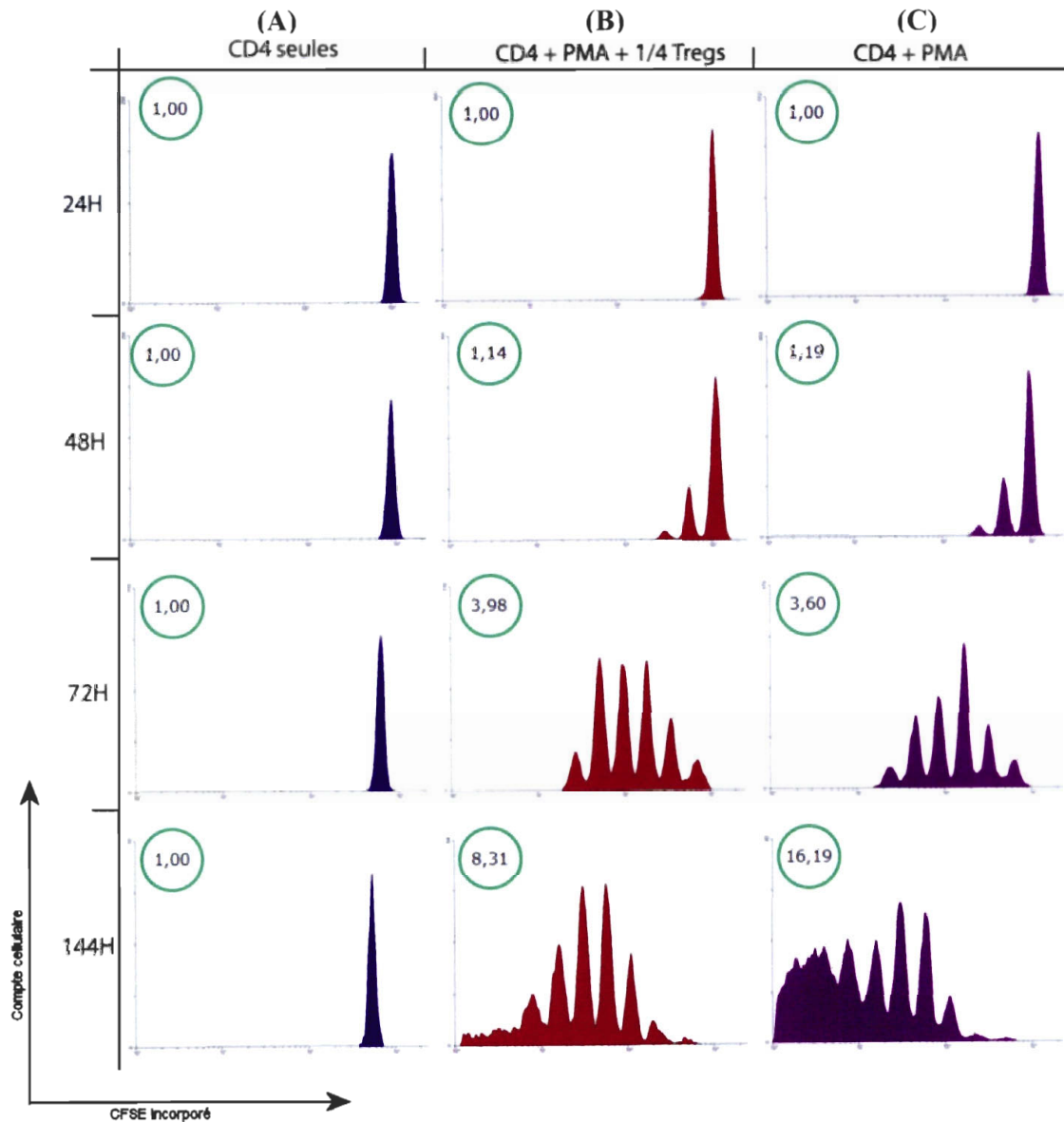


Figure 4-5: Inhibition de la prolifération cellulaire par les Tregs

A) Lorsque non-stimulés, les LT CD4 ne se divisent pas par eux-mêmes. De plus, ce contrôle négatif démontre la stabilité dans le temps de notre marquage. B) et C) L'utilisation de Tregs diminue de 50% la prolifération des CD4 stimulés à la PMA/ionomycine au sixième jour.

La figure 4-6, quant à elle, schématise très bien l'évolution des divers indices de prolifération tout au long de l'expérience. Dans ce graphique, l'effet est maximal au 6^e jour avec une diminution de 50% de l'indice de prolifération. Après sept jours, la prolifération des cellules CD4⁺ non-inhibées diminue plus vite que celle des cellules CD4⁺ inhibées. Cette observation s'explique par le simple fait que les cellules CD4⁺ non-inhibées commencent à saturer leur milieu, épuisant ainsi leur milieu de culture. Selon plusieurs études, cet effet peut être évité facilement par un simple changement de milieu [372]. Cependant, un tel changement ou un rajout de milieu frais diminuerait la concentration des diverses cytokines pro et anti-inflammatoires présentes, ce qui diminuerait l'effet des Tregs, augmentant du coup la prolifération des LT CD4⁺.

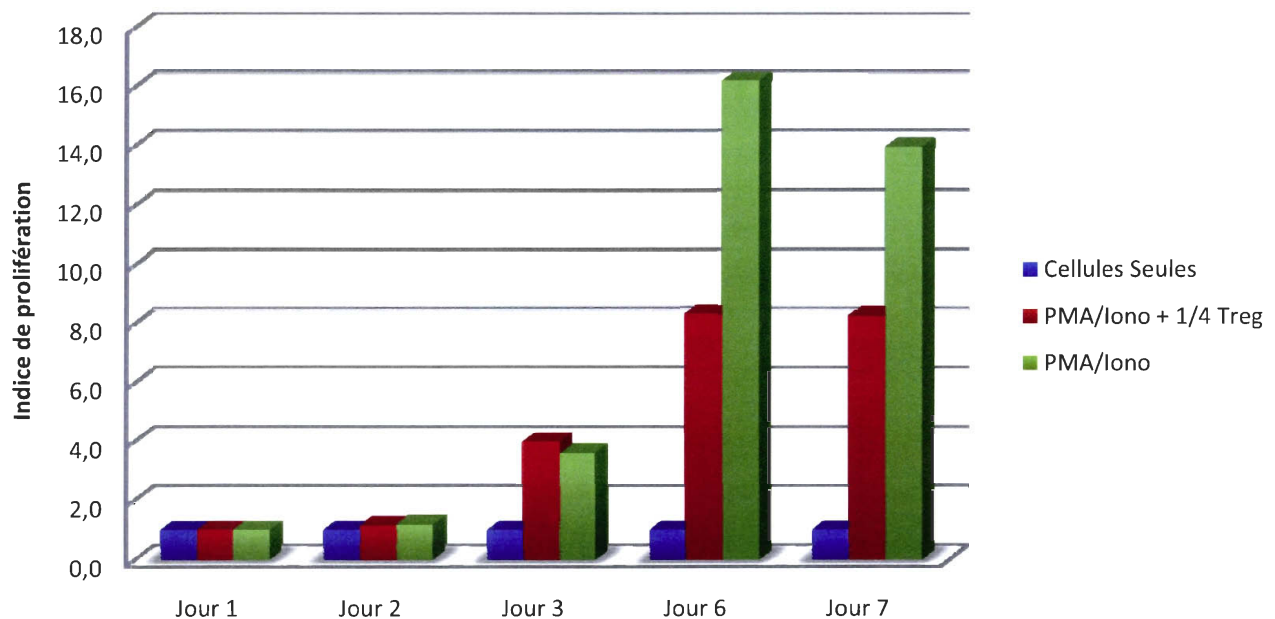


Figure 4-6: Schématisation de l'indice de prolifération dans le temps

Cette figure, réalisée à partir des indices de prolifération de la figure 4-5, démontre clairement que les Tregs ont un effet sur la prolifération entre le 3^e et le 6^e jour de culture. À partir du 6^e jour, la prolifération des puits contenant les Tregs est diminuée de moitié malgré une forte stimulation à la PMA/ionomycine activant la voie de la PKC.

4.5 Discussion

Moduler les réponses du système immunitaire avec un type de cellules qui n'est pas encore entièrement maîtrisé est quelque peu avant-gardiste et est considéré par plusieurs comme étant un pari très osé [346]. Les effets de ces cellules sont beaucoup plus variables que l'utilisation d'une simple drogue, les courbes doses/réponses sont excessivement changeantes *in vivo* et plusieurs facteurs encore inconnus peuvent venir influencer leurs effets, et ce tant *in vivo* qu'*in vitro*. Au niveau de la communauté scientifique en général, les rôles et fonctions des Tregs sont de mieux en mieux connus, s'approchant ainsi d'une fonction future thérapeutique chaque jour [402]. Plusieurs études ont démontré avec succès que l'on pouvait multiplier des Tregs *in vitro* [403, 404] et *in vivo* [405, 406] afin d'obtenir une tolérance périphérique. De plus, il a été démontré que les Tregs qui ont proliféré de manière spécifique *in vitro* sont beaucoup plus efficaces, réduisant ainsi le nombre requis tout comme leurs effets secondaires [382, 407, 408].

En ce qui concerne le ratio Tregs versus LT effecteurs nécessaire pour une suppression efficace de la réponse immunitaire, il a été démontré que plus il y avait de Tregs, plus il y avait de suppression [409, 410]. Pour ce qui est de la survie du greffon après un protocole de tolérance périphérique, la quantité de Tregs fraîchement isolés nécessaires est beaucoup plus grande que lors des manipulations *in vitro*, soit un ratio de 4:1 au lieu d'un ratio 1:8 [411]. Ce haut ratio de Tregs nécessaires *in vivo* peut être dû à la méthode d'inhibition de ces derniers. En effet, plusieurs études suggèrent que les Tregs sont en constant combat au site de transplantation et inhibent continuellement les LT effecteurs [412, 413]. Ainsi, une simple infection opportuniste pourrait éventuellement faire augmenter le nombre de LT effecteurs. Dans l'éventualité où ces LT effecteurs auraient une affinité partielle avec les cellules que les Tregs protègent, la tolérance périphérique tomberait et la greffe serait rejetée. Quant au mécanisme de suppression, il n'est pas déterminé hors de tout doute raisonnable, mais plusieurs expériences démontrent que l'activation des Tregs est spécifique à l'antigène [11]. Cependant, une fois activés, ces derniers inhibent les LT effecteurs de manière non-spécifique [371].

En ce qui concerne les tentatives d'incorporation d'un protocole de tolérance périphérique utilisant les Tregs à un protocole de tolérance centrale, elles sont peu nombreuses, voir quasi absentes de la littérature scientifique [414]. Cependant, la combinaison de ces deux types de protocoles résoudrait un des problèmes actuels de la tolérance périphérique, c'est-à-dire la stabilité à long terme. Cette instabilité oblige actuellement les chercheurs à injecter une quantité faramineuse de Tregs, amenant du coup une série de problèmes comme des réactions non-spécifiques des Tregs. De plus, il peut se créer une tolérisation non-souhaitée lors de l'injection d'un trop grand nombre de Tregs, se comparant ainsi à une immunosuppression. Cependant, plusieurs molécules peuvent être utilisées pour moduler dans le temps la suppression effectuée par les Tregs. Par exemple, l'insertion d'IL-2 [359, 415] ou de TNF- α [416] peut abroger les effets des Tregs de manière temporaire. Ainsi, un individu tolérisé uniquement à l'aide de Tregs pourrait se défendre efficacement contre une infection microbienne. Évidemment, utiliser un traitement spécial à chaque infection n'est vraiment pas une situation idéale et n'est pas envisageable au niveau thérapeutique. De plus, il a été rapporté qu'un trop grand nombre de Tregs peut favoriser le développement d'un cancer [375], ce qui valorise encore plus notre concept d'incorporation à un protocole de tolérance centrale.

Évidemment, ces présents travaux ne sont pas à 100% complétés et plusieurs expériences restent à être effectuées. Dans le but de faciliter ces expériences, un nouvel outil est à la disposition des chercheurs : les souris FIR. Cette lignée de souris d'origine C57BL/6 a été manipulée génétiquement afin que les cellules produisant le FoxP3 co-expriment une protéine fluorescente rouge. Plus précisément, le promoteur normal du FoxP3 a été remplacé par un promoteur bicistronique permettant ainsi de produire cette fameuse protéine à chaque fois afin que le promoteur du FoxP3 enclenche la traduction. Pour ce qui est des données techniques, cette protéine fluorescente doit être excitée avec un laser au krypton produisant une longueur d'onde de 568 nm afin d'émettre une longueur d'onde dans les environs de 600 nm [417]. Ces souris peuvent être achetées chez *Charles River Laboratories* et pourraient s'avérer très utiles.

Au niveau du développement du protocole en tant que tel, les deux dernières sections restent encore à être optimisées. Tout d'abord, la multiplication *in vivo* des Tregs est la prochaine étape sur laquelle il faudra se concentrer. Cette section du protocole tire ses fondements en grande partie sur des expériences conduites à Toulouse par Olivier Joffre [372, 418] ainsi que celles effectuées à Philadelphie par Patrick T. Walsh [11]. Théoriquement, 2×10^3 Tregs provenant d'une souris MDX seront cultivés durant 14 jours dans l'un des puits d'une plaque de 96 puits à fond rond, le tout en présence de 5×10^5 splénocytes irradiés à 17 Gy provenant d'une souris Balb/c. Ils seront placés initialement dans un total de 200 μ l de milieu de culture et un autre 100 μ l de milieu frais seront rajoutés au 7^e jour dans chacun des puits. La culture sera arrêtée au 14^e jour et les Tregs seront purifiés à nouveau par sélection magnétique. Par la suite les cellules seront analysées par FACS avant d'être testés tant *in vivo* pour leur capacité à établir une tolérance périphérique. Parallèlement à ces expériences, des tests *in vitro* seront également effectués afin de vérifier leur potentiel d'inhibition.

Une fois les Tregs multipliés et testés, la dernière étape de ces expériences est d'incorporer au protocole de tolérance centrale les Tregs fraîchement multipliés de manière spécifique. Pour ce faire, ils seront incorporés au protocole de tolérance centrale développé à Québec par le Dr Stéphan [1] (Voir la section 3.5.1.4 Le TTCB). Rapidement, la DST ainsi que la cyclophosphamide vont être remplacées par différentes doses de Tregs couvrant cinq logs, soit de 1×10^3 à 1×10^7 Tregs. Après les injections de tréosulfan et de moelle osseuse, des tests de chimérisme vont être effectués afin de déterminer la dose efficace minimale. Une fois cette dose déterminée, des tentatives de greffes pourront être effectuées. Plus précisément, le protocole de tolérance va être effectué chez une souris MDX et par la suite, des greffes de peau provenant d'une Balb/c ainsi que d'un tiers haplotype, C3H, vont être effectuées chez cette souris. Parallèlement à ces greffes de peau, des transplantations de myoblastes provenant également de Balb/c et de C3H vont être réalisées chez d'autres souris MDX tolérisées. En suivant l'évolution de ces greffes à court, moyen et long terme, nous pourrions déterminer l'efficacité de ce protocole et peut être l'amener chez des modèles animaux ressemblant plus à l'homme.

4.6 Conclusion

Dans ces présents travaux, nous avons démontré que l'isolation des lymphocytes T régulateurs peut se faire aisément. Leur caractérisation est aussi une étape plus ou moins complexe lorsque les bons outils sont mis au point. Cependant, les difficultés se présentent aussitôt que l'on tente d'étudier l'inhibition des Tregs via les diverses interactions cellulaires de manière *in vitro*. Néanmoins, l'objectif de prouver l'inhibition cellulaire *in vitro* a également été réalisé dans ces travaux.

Évidemment, beaucoup de travail reste à accomplir afin de mener à terme ce projet de tolérance mixte. Tout d'abord, une amélioration des protocoles de prolifération des Tregs *in vitro* doit être effectuée, afin d'en avoir en nombre suffisant et d'optimiser leurs effets. Par la suite, il faudra s'attaquer aux effets de nos Tregs *in vivo* en établissant une courbe dose/réponse des populations fraîchement isolées, multipliées et injectées chez des souris. Une fois la quantité de Tregs nécessaires déterminée, il faudra calculer la fenêtre de tolérance périphérique afin de remplacer la cyclophosphamide au sein du TTCB. Ce n'est qu'une fois cette fenêtre de tolérance déterminée que l'on pourra effectuer l'expérience complète. Ainsi, il sera possible de peaufiner le tout nouveau protocole de tolérance mixte appelé temporairement le TTB, pour Tregs, Tréosulfan, BMT. Une fois tolérisée, une foule de tests pourront être conduits chez la souris MDX, dont le plus intéressant pour nous : la greffe de myoblastes.

Seulement lorsque toutes ces étapes seront franchies chez la souris, nous pourrons passer aux modèles animaux suivant afin de se rapprocher continuellement d'une utilisation chez l'homme. Tout d'abord, le chien pourra être utilisé étant donné que c'est un excellent modèle de DMD. Parallèlement aux expérimentations conduites chez le chien, un ajustement de protocole pourrait être effectué chez le singe puisque son système immunitaire se rapproche grandement avec celui de l'homme.

Conclusion générale

Guérir la dystrophie musculaire de Duchenne est en soi un défi de taille. Tout d'abord, la grosseur de la protéine en cause, la dystrophine, ne permet malheureusement pas d'utiliser la majorité des outils mis à notre disposition grâce à la génétique moderne. De plus, cette maladie affecte tous les muscles du patient dystrophique, dont certains sont très difficiles d'accès. Au sein même de notre laboratoire, les preuves de l'efficacité de la thérapie cellulaire ont déjà été démontrées chez différents modèles animaux. De plus, divers essais cliniques ont démontré le grand potentiel de la thérapie cellulaire chez l'homme.

Comment mentionné précédemment, trois barrières restent à être franchies avant d'avoir un traitement efficace via la thérapie cellulaire. Tout d'abord, les problèmes de la mort cellulaire et de la migration doivent être résolus pour avoir une thérapie applicable à grande échelle. Toutefois, il est à noter que ces problèmes ne sont pas critiques pour établir les différentes preuves de principes reliées à la greffe de myoblastes. Ainsi, nous pourront effectuer les différentes preuves de principes de cette thérapie qui ne sera qu'améliorée par la suite.

Quant au problème de la réponse immune, il a été résolu en grande partie chez la souris par la création du protocole de tolérance centrale mis au point par le Dr Lionel Stéphan. De plus, il est présentement en cour d'optimisation chez le chien et le singe ouvrant ainsi le chemin à une future thérapie utilisant les Tregs. Évidemment, ce protocole est difficile à faire accepter par les différents comités d'éthique n'ayant pas une connaissance approfondie du sujet. Sa toxicité temporaire au niveau du système immunitaire sain du patient dystrophique est mal vu par certain. De plus, de nombreux effets à long terme peuvent être ressentis chez le patient dystrophique suite à l'utilisation de la cyclophosphamide comme la stérilité, la perte de cheveux, les nausées, etc. C'est ainsi qu'avant même que le TTCB ne soit rendu en essai clinique chez l'homme, nous travaillons déjà à son optimisation.

L'utilisation des Tregs va permettre de réduire de beaucoup cette toxicité, ce qui va aider ainsi de franchir la dernière barrière à la thérapie cellulaire : la réponse immune envers les myoblastes greffés. Ces cellules proviennent du patient, ne sont pas modifiées génétiquement et n'ont théoriquement aucune effets secondaires sur le patients. Il est à noter qu'avec l'avènement des cellules souches, des traitements à grande échelle deviennent de plus en plus envisageables offrant aux chercheurs et aux patients une quantité théoriquement infinie de cellules.

Bibliographie

1. Stephan, L., et al., *Induction of tolerance across fully mismatched barriers by a nonmyeloablative treatment excluding antibodies or irradiation use*. Cell Transplant, 2006. **15**(8-9): p. 835-46.
2. Levy, G.A., *Advances in Xenotransplantation*. 2007: Toronto, Ontario. p. 107.
3. Molecular_Probes_Inc, *CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (C34554)*, Mp34554.pdf, Editor. 2005, Molecular Probes Inc.
4. Westad, K., *Big Wendy the muscular whippet*, in *Times Colonist*. 2007, CanWest MediaWorks publications Inc.: Victoria.
5. Marieb, E.N. and R. Lachaine, *Anatomie et physiologie humaines*. 2e éd. -- ed. 1999, Saint-Laurent: Éditions du Renouveau pédagogique. xxi, 1194 p.
6. Tortora, G.J., J.-C. Parent, and S.R. Grabowski, *Principes d'anatomie et de physiologie*. Nouv. éd. -- ed. 1994, Montréal: CEC Collégial et universitaire. [xxxii], 1204 p.
7. Stephan, L., *Amélioration de la transplantation de myoblastes, un traitement possible de la Dystrophie Musculaire de Duchenne. Utilisation de la forme active de la vitamine D3 et obtention d'une tolérance immunologique via l'administration de drogues cytoréductrices.*, in *Faculté de médecine*. 2007, Université Laval: Québec. p. 207.
8. Stedman, T.L., *Stedman's medical dictionary for the health professions and nursing*. Illustrated 5th ed. 2005, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. xxxii, 1597, App 557, [72] of plates.
9. Tyler, K.L., *Origins and early descriptions of "Duchenne muscular dystrophy"*. Muscle Nerve, 2003. **28**(4): p. 402-22.
10. Roberts, R.G., *Dystrophins and dystrobrevins*. Genome Biol, 2001. **2**(4): p. REVIEWS3006.
11. Walsh, P.T., D.K. Taylor, and L.A. Turka, *Tregs and transplantation tolerance*. J Clin Invest, 2004. **114**(10): p. 1398-403.
12. Skuk, D., et al., *Myoblast transplantation in whole muscle of nonhuman primates*. J Neuropathol Exp Neurol, 2000. **59**(3): p. 197-206.
13. Cossu, G., et al., *Activation of different myogenic pathways: myf-5 is induced by the neural tube and MyoD by the dorsal ectoderm in mouse paraxial mesoderm*. Development, 1996. **122**(2): p. 429-37.
14. Dietrich, S., et al., *Specification of the hypaxial musculature*. Development, 1998. **125**(12): p. 2235-49.
15. Pourquie, O., et al., *Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: a role for BMP4*. Cell, 1996. **84**(3): p. 461-71.
16. Gilbert, S.F. and S.R. Singer, *Biologie du développement*. 2e éd. ed. 2004, Bruxelles: De Boeck. xviii, 836 p.
17. Ikeya, M. and S. Takada, *Wnt signaling from the dorsal neural tube is required for the formation of the medial dermomyotome*. Development, 1998. **125**(24): p. 4969-76.
18. Munsterberg, A.E., et al., *Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite*. Genes Dev, 1995. **9**(23): p. 2911-22.

19. Stern, H.M., A.M. Brown, and S.D. Hauschka, *Myogenesis in paraxial mesoderm: preferential induction by dorsal neural tube and by cells expressing Wnt-1*. Development, 1995. **121**(11): p. 3675-86.
20. Charge, S.B. and M.A. Rudnicki, *Cellular and molecular regulation of muscle regeneration*. Physiol Rev, 2004. **84**(1): p. 209-38.
21. Shi, X. and D.J. Garry, *Muscle stem cells in development, regeneration, and disease*. Genes Dev, 2006. **20**(13): p. 1692-708.
22. Alderton, J.M. and R.A. Steinhardt, *Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes*. J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9452-60.
23. Belcastro, A.N., L.D. Shewchuk, and D.A. Raj, *Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis*. Mol Cell Biochem, 1998. **179**(1-2): p. 135-45.
24. Balcerzak, D., et al., *An antisense oligodeoxyribonucleotide to m-calpain mRNA inhibits myoblast fusion*. J Cell Sci, 1995. **108** (Pt 5): p. 2077-82.
25. Alderton, J.M. and R.A. Steinhardt, *How calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes*. Trends Cardiovasc Med, 2000. **10**(6): p. 268-72.
26. Coulton, G.R., et al., *The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation*. Neuropathol Appl Neurobiol, 1988. **14**(1): p. 53-70.
27. Nicholson, G.A., et al., *Carrier detection in Duchenne muscular dystrophy: Assessment of the effect of age on detection-rate with serum-creatine-kinase-activity*. Lancet, 1979. **1**(8118): p. 692-4.
28. Percy, M.E., et al., *Serum creatine kinase and pyruvate kinase in Duchenne muscular dystrophy carrier detection*. Muscle Nerve, 1979. **2**(5): p. 329-39.
29. Rappolee, D.A. and Z. Werb, *Macrophage-derived growth factors*. Curr Top Microbiol Immunol, 1992. **181**: p. 87-140.
30. Tidball, J.G., *Inflammatory cell response to acute muscle injury*. Med Sci Sports Exerc, 1995. **27**(7): p. 1022-32.
31. Lescaudron, L., et al., *Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant*. Neuromuscul Disord, 1999. **9**(2): p. 72-80.
32. Merly, F., et al., *Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation*. Muscle Nerve, 1999. **22**(6): p. 724-32.
33. Lovering, R.M., N.C. Porter, and R.J. Bloch, *The muscular dystrophies: from genes to therapies*. Phys Ther, 2005. **85**(12): p. 1372-88.
34. Conte, G. and L. Gioja, *Scrofolo del sistema muscolare*. Annali Clinici dell'Ospedale degli Incurabili di Napoli, 1836. **2**: p. 66-79.
35. Bell, C., *The nervous system of the human body*. 1830, London,: Longman, Rees, Orme, Brown, and Green. xxiii, 238, clxxvi p.
36. Emery, A.E., *Muscular dystrophy into the new millennium*. Neuromuscul Disord, 2002. **12**(4): p. 343-9.
37. Meryon, E., *On Granular and Fatty Degeneration of the Voluntary Muscles*. Med Chir Trans, 1851. **35**: p. 73-84.
38. Duchenne, G.B., *De l'électrisation localisée et de son application à la pathologie et à la thérapeutique*. 2. éd. entièrement refondue, avec 179 figures intercalées dans le

- texte et 1 planche lithographiée. ed. 1861, Paris,: J.-B. Baillière et fils; [etc. xi, 1046 p.
39. Duchenne, G.B., *De la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ou paralysie myo-sclérosique*. 1868, Paris,: P. Asselin. 132 p.
 40. Duchenne, G.B., *De l'électrisation localisée et de son application à la pathologie et la thérapeutique, par courants induits et par courants galvaniques interrompus et continus*. 1872, Paris,: Baillière. xii, 1120 p.
 41. Partridge, R., *Fatty degeneration of voluntary muscle*. *Med Time Gaz*, 1847. **5**: p. 944.
 42. Little, W.J., *On the nature and treatment of the deformities of the human frame : being a course of lectures delivered at the Royal Orthopaedic Hospital in 1843, with numerous notes and additions to the present time*. 1853, London: Longman, Brown, Green, and Longmans. x, [2], 412, [2], 24 p.
 43. Engel, A. and C. Franzini-Armstrong, *Myology : basic and clinical*. 2nd ed. 1994, New York: McGraw-Hill, Health Professions Division. 2 v. (xxi, 1937, 44 p.).
 44. Ciafaloni, E. and R.T. Moxley, *Treatment options for duchenne muscular dystrophy*. *Curr Treat Options Neurol*, 2008. **10**(2): p. 86-93.
 45. Koenig, M., A.P. Monaco, and L.M. Kunkel, *The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein*. *Cell*, 1988. **53**(2): p. 219-28.
 46. Blau, H.M., C. Webster, and G.K. Pavlath, *Defective myoblasts identified in Duchenne muscular dystrophy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. **80**(15): p. 4856-60.
 47. Engel, A. and C. Franzini-Armstrong, *Myology : basic and clinical*. 3rd ed. 2004, New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division. 2 v. (1960 p.).
 48. Emery, A.E., *Duchenne muscular dystrophy. Genetic aspects, carrier detection and antenatal diagnosis*. *Br Med Bull*, 1980. **36**(2): p. 117-22.
 49. Gardner-Medwin, D., *Mutation rate in Duchenne type of muscular dystrophy*. *J Med Genet*, 1970. **7**(4): p. 334-7.
 50. Emery, A.E.H. and F. Muntoni, *Duchenne muscular dystrophy*. 3rd ed. 2003, Oxford: Oxford University Press. x, 270 p., [2] p. de pl.
 51. Gowers, W.R., *A manual of diseases of the nervous system*. 1886, London,: Churchill. 2 v.
 52. Allsop, K.G. and F.A. Ziter, *Loss of strength and functional decline in Duchenne's dystrophy*. *Arch Neurol*, 1981. **38**(7): p. 406-11.
 53. Cohen, L., et al., *A statistical analysis of the loss of muscle strength in Duchenne's muscular dystrophy*. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1982. **37**(1): p. 123-38.
 54. Brooke, M.H., et al., *The natural history of Duchenne muscular dystrophy: a caveat for therapeutic trials*. *Trans Am Neurol Assoc*, 1981. **106**: p. 195-9.
 55. Kinali, M., et al., *Management of scoliosis in Duchenne muscular dystrophy: a large 10-year retrospective study*. *Dev Med Child Neurol*, 2006. **48**(6): p. 513-8.
 56. Mukoyama, M., et al., *Life spans of Duchenne muscular dystrophy patients in the hospital care program in Japan*. *J Neurol Sci*, 1987. **81**(2-3): p. 155-8.
 57. Wulfsberg, E.A. and R.R. Skoglund, *Duchenne muscular dystrophy in a 46 XY female*. *Clin Pediatr (Phila)*, 1986. **25**(5): p. 276-8.
 58. Greenstein, R.M., et al., *An (X;11) translocation in a girl with Duchenne muscular dystrophy. Repository identification No. GM1695*. *Cytogenet Cell Genet*, 1980. **27**(4): p. 268.

59. Jacobs, P.A., et al., *Duchenne muscular dystrophy (DMD) in a female with an X/autosome translocation: further evidence that the DMD locus is at Xp21*. Am J Hum Genet, 1981. **33**(4): p. 513-8.
60. Lindenbaum, R.H., et al., *Muscular dystrophy in an X; 1 translocation female suggests that Duchenne locus is on X chromosome short arm*. J Med Genet, 1979. **16**(5): p. 389-92.
61. Gomez, M.R., et al., *Failure of inactivation of Duchenne dystrophy X-chromosome in one of female identical twins*. Neurology, 1977. **27**(6): p. 537-41.
62. Monaco, A.P., et al., *Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene*. Nature, 1986. **323**(6089): p. 646-50.
63. Hoffman, E.P., R.H. Brown, Jr., and L.M. Kunkel, *Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus*. Cell, 1987. **51**(6): p. 919-28.
64. Koenig, M., 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**(3): p. 509-17.
65. Kunkel, L.M., et al., *Molecular studies of progressive muscular dystrophy (Duchenne)*. Enzyme, 1987. **38**(1-4): p. 72-5.
66. Bies, R.D., et al., *Human and murine dystrophin mRNA transcripts are differentially expressed during skeletal muscle, heart, and brain development*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(7): p. 1725-31.
67. Feener, C.A., M. Koenig, and L.M. Kunkel, *Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus*. Nature, 1989. **338**(6215): p. 509-11.
68. Barnea, E., et al., *Specificity of expression of the muscle and brain dystrophin gene promoters in muscle and brain cells*. Neuron, 1990. **5**(6): p. 881-8.
69. Boyce, F.M., et al., *Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(4): p. 1276-80.
70. Nudel, U., et al., *Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain*. Nature, 1989. **337**(6202): p. 76-8.
71. Gorecki, D.C., et al., *Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters*. Hum Mol Genet, 1992. **1**(7): p. 505-10.
72. Bar, S., 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**(2): p. 557-60.
73. Hugnot, J.P., et al., *Distal transcript of the dystrophin gene initiated from an alternative first exon and encoding a 75-kDa protein widely distributed in nonmuscle tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(16): p. 7506-10.
74. Lederfein, D., et al., *A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(12): p. 5346-50.
75. Byers, T.J., H.G. Lidov, and L.M. Kunkel, *An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve*. Nat Genet, 1993. **4**(1): p. 77-81.
76. Ahn, A.H. and L.M. Kunkel, *The structural and functional diversity of dystrophin*. Nat Genet, 1993. **3**(4): p. 283-91.
77. Durbeej, M., et al., *Transient expression of Dp140, a product of the Duchenne muscular dystrophy locus, during kidney tubulogenesis*. Dev Biol, 1997. **181**(2): p. 156-67.

78. Muntoni, F., S. Torelli, and A. Ferlini, *Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes*. *Lancet Neurol*, 2003. **2**(12): p. 731-40.
79. Blake, D.J., et al., *G-utrophin, the autosomal homologue of dystrophin Dp116, is expressed in sensory ganglia and brain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(9): p. 3697-701.
80. Culligan, K.G., et al., *Role of dystrophin isoforms and associated proteins in muscular dystrophy (review)*. *Int J Mol Med*, 1998. **2**(6): p. 639-48.
81. D'Souza, V.N., et al., *A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology*. *Hum Mol Genet*, 1995. **4**(5): p. 837-42.
82. Imamura, M. and E. Ozawa, *Differential expression of dystrophin isoforms and utrophin during dibutyril-cAMP-induced morphological differentiation of rat brain astrocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(11): p. 6139-44.
83. Lumeng, C.N., et al., *Characterization of dystrophin and utrophin diversity in the mouse*. *Hum Mol Genet*, 1999. **8**(4): p. 593-9.
84. Roberts, R.G., R.J. Gardner, and M. Bobrow, *Searching for the 1 in 2,400,000: a review of dystrophin gene point mutations*. *Hum Mutat*, 1994. **4**(1): p. 1-11.
85. Sadoulet-Puccio, H.M., M. Rajala, and L.M. Kunkel, *Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(23): p. 12413-8.
86. Davison, M.D. and D.R. Critchley, *alpha-Actinins and the DMD protein contain spectrin-like repeats*. *Cell*, 1988. **52**(2): p. 159-60.
87. Moores, C.A., N.H. Keep, and J. Kendrick-Jones, *Structure of the utrophin actin-binding domain bound to F-actin reveals binding by an induced fit mechanism*. *J Mol Biol*, 2000. **297**(2): p. 465-80.
88. Norwood, F.L., et al., *The structure of the N-terminal actin-binding domain of human dystrophin and how mutations in this domain may cause Duchenne or Becker muscular dystrophy*. *Structure*, 2000. **8**(5): p. 481-91.
89. Ervasti, J.M. and K.P. Campbell, *A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin*. *J Cell Biol*, 1993. **122**(4): p. 809-23.
90. Matsumura, K., et al., *Deficiency of dystrophin-associated proteins in Duchenne muscular dystrophy patients lacking COOH-terminal domains of dystrophin*. *J Clin Invest*, 1993. **92**(2): p. 866-71.
91. Suzuki, A., et al., *Glycoprotein-binding site of dystrophin is confined to the cysteine-rich domain and the first half of the carboxy-terminal domain*. *FEBS Lett*, 1992. **308**(2): p. 154-60.
92. Ponting, C.P., et al., *ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins*. *Trends Biochem Sci*, 1996. **21**(1): p. 11-13.
93. Crawford, G.E., et al., *Assembly of the dystrophin-associated protein complex does not require the dystrophin COOH-terminal domain*. *J Cell Biol*, 2000. **150**(6): p. 1399-410.
94. Ahn, A.H. and L.M. Kunkel, *Syntrophin binds to an alternatively spliced exon of dystrophin*. *J Cell Biol*, 1995. **128**(3): p. 363-71.
95. Ehmsen, J., E. Poon, and K. Davies, *The dystrophin-associated protein complex*. *J Cell Sci*, 2002. **115**(Pt 14): p. 2801-3.
96. Bulfield, G., et al., *X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. **81**(4): p. 1189-92.

97. Hoffman, E.P. and J.R.M. Gorospe, *The animal models of Duchenne muscular dystrophy : windows on the pathophysiological consequences of dystrophin deficiency*. *Curr top memb*, 1991. **38**: p. 113-154.
98. Partridge, T., *Animal models of muscular dystrophy--what can they teach us?* *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1991. **17**(5): p. 353-63.
99. Sicinski, P., et al., *The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation*. *Science*, 1989. **244**(4912): p. 1578-80.
100. Pillers, D.A., et al., *Effects of dystrophin isoforms on signal transduction through neural retina: genotype-phenotype analysis of duchenne muscular dystrophy mouse mutants*. *Mol Genet Metab*, 1999. **66**(2): p. 100-10.
101. De la Porte, S., S. Morin, and J. Koenig, *Characteristics of skeletal muscle in mdx mutant mice*. *Int Rev Cytol*, 1999. **191**: p. 99-148.
102. Tanabe, Y., K. Esaki, and T. Nomura, *Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse*. *Acta Neuropathol*, 1986. **69**(1-2): p. 91-5.
103. Torres, L.F. and L.W. Duchen, *The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates*. *Brain*, 1987. **110** (Pt 2): p. 269-99.
104. Nonaka, I., *Animal models of muscular dystrophies*. *Lab Anim Sci*, 1998. **48**(1): p. 8-17.
105. Pastoret, C. and A. Sebille, *Age-related differences in regeneration of dystrophic (mdx) and normal muscle in the mouse*. *Muscle Nerve*, 1995. **18**(10): p. 1147-54.
106. Pastoret, C. and A. Sebille, *mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age*. *J Neurol Sci*, 1995. **129**(2): p. 97-105.
107. Lefaucheur, J.P., C. Pastoret, and A. Sebille, *Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice*. *Anat Rec*, 1995. **242**(1): p. 70-6.
108. Bobet, J., R.F. Mooney, and T. Gordon, *Force and stiffness of old dystrophic (mdx) mouse skeletal muscles*. *Muscle Nerve*, 1998. **21**(4): p. 536-9.
109. Bobet, J. and R.B. Stein, *A simple model of force generation by skeletal muscle during dynamic isometric contractions*. *IEEE Trans Biomed Eng*, 1998. **45**(8): p. 1010-6.
110. Coulton, G.R., et al., *The mdx mouse skeletal muscle myopathy: II. Contractile properties*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1988. **14**(4): p. 299-314.
111. Araki, E., et al., *Targeted disruption of exon 52 in the mouse dystrophin gene induced muscle degeneration similar to that observed in Duchenne muscular dystrophy*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **238**(2): p. 492-7.
112. Blank, M., et al., *Dystrophin and beta-dystroglycan in photoreceptor terminals from normal and mdx3Cv mouse retinæ*. *Eur J Neurosci*, 1999. **11**(6): p. 2121-33.
113. Chao, D.S., F. Silvagno, and D.S. Bredt, *Muscular dystrophy in mdx mice despite lack of neuronal nitric oxide synthase*. *J Neurochem*, 1998. **71**(2): p. 784-9.
114. Cox, G.A., et al., *New mdx mutation disrupts expression of muscle and nonmuscle isoforms of dystrophin*. *Nat Genet*, 1993. **4**(1): p. 87-93.
115. Crosbie, R.H., et al., *mdx muscle pathology is independent of nNOS perturbation*. *Hum Mol Genet*, 1998. **7**(5): p. 823-9.
116. Danko, I., V. Chapman, and J.A. Wolff, *The frequency of revertants in mdx mouse genetic models for Duchenne muscular dystrophy*. *Pediatr Res*, 1992. **32**(1): p. 128-31.

117. Deconinck, A.E., et al., *Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy*. Cell, 1997. **90**(4): p. 717-27.
118. Deconinck, N., et al., *Consequences of the combined deficiency in dystrophin and utrophin on the mechanical properties and myosin composition of some limb and respiratory muscles of the mouse*. Neuromuscul Disord, 1998. **8**(6): p. 362-70.
119. Grady, R.M., et al., *Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy*. Cell, 1997. **90**(4): p. 729-38.
120. Im, W.B., et al., *Differential expression of dystrophin isoforms in strains of mdx mice with different mutations*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(8): p. 1149-53.
121. Megeney, L.A., et al., *MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle*. Genes Dev, 1996. **10**(10): p. 1173-83.
122. Megeney, L.A., et al., *Severe cardiomyopathy in mice lacking dystrophin and MyoD*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(1): p. 220-5.
123. Porter, J.D., et al., *The sparing of extraocular muscle in dystrophinopathy is lost in mice lacking utrophin and dystrophin*. J Cell Sci, 1998. **111** (Pt 13): p. 1801-11.
124. Rafael, J.A., et al., *Forced expression of dystrophin deletion constructs reveals structure-function correlations*. J Cell Biol, 1996. **134**(1): p. 93-102.
125. Rafael, J.A., et al., *Dystrophin and utrophin do not play crucial roles in nonmuscle tissues in mice*. Muscle Nerve, 1999. **22**(4): p. 517-9.
126. Carpenter, J.L., et al., *Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency*. Am J Pathol, 1989. **135**(5): p. 909-19.
127. Gashen, F.P., P.G. Haugh, and M.A. Swendrowski, *Hypertrophic feline muscular dystrophy a unique clinical expression of dystrophin deficiency*. Feline Practice, 1994. **22**: p. 23-26.
128. Winand, N.J., et al., *Deletion of the dystrophin muscle promoter in feline muscular dystrophy*. Neuromuscul Disord, 1994. **4**(5-6): p. 433-45.
129. Berry, C.R., F.P. Gaschen, and N. Ackerman, *Radiographic and Ultrasonographic Features of Hypertrophic Feline Muscular Dystrophy in Two Cats*. Veterinary Radiology Ultrasound, 1992. **33**(6).
130. Lin, S., F. Gaschen, and J.M. Burgunder, *Utrophin is a regeneration-associated protein transiently present at the sarcolemma of regenerating skeletal muscle fibers in dystrophin-deficient hypertrophic feline muscular dystrophy*. J Neuropathol Exp Neurol, 1998. **57**(8): p. 780-90.
131. Vos, J.H., J.S. van der Linde-Sipman, and S.A. Goedegebuure, *Dystrophy-like myopathy in the cat*. J Comp Pathol, 1986. **96**(3): p. 335-41.
132. Kornegay, J.N., et al., *Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs*. Muscle Nerve, 1988. **11**(10): p. 1056-64.
133. Valentine, B.A., et al., *Progressive muscular dystrophy in a golden retriever dog: light microscope and ultrastructural features at 4 and 8 months*. Acta Neuropathol, 1986. **71**(3-4): p. 301-10.
134. Cooper, B.J., et al., *Mosaic expression of dystrophin in carriers of canine X-linked muscular dystrophy*. Lab Invest, 1990. **62**(2): p. 171-8.
135. Schatzberg, S., et al., *A polymerase chain reaction screening strategy for the promoter of the canine dystrophin gene*. Am J Vet Res, 1999. **60**(9): p. 1040-6.
136. Schatzberg, S.J., et al., *Molecular analysis of a spontaneous dystrophin 'knockout' dog*. Neuromuscul Disord, 1999. **9**(5): p. 289-95.

137. Bartlett, R.J., et al., *Mutation segregation and rapid carrier detection of X-linked muscular dystrophy in dogs*. Am J Vet Res, 1996. **57**(5): p. 650-4.
138. Cooper, B.J., et al., *The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs*. Nature, 1988. **334**(6178): p. 154-6.
139. Howell, J.M., et al., *Use of the dog model for Duchenne muscular dystrophy in gene therapy trials*. Neuromuscul Disord, 1997. **7**(5): p. 325-8.
140. Schatzberg, S.J., et al., *Alternative dystrophin gene transcripts in golden retriever muscular dystrophy*. Muscle Nerve, 1998. **21**(8): p. 991-8.
141. Sharp, N.J., et al., *An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy*. Genomics, 1992. **13**(1): p. 115-21.
142. Valentine, B.A., et al., *Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies*. J Neurol Sci, 1988. **88**(1-3): p. 69-81.
143. Valentine, B.A., J.N. Kornegay, and B.J. Cooper, *Clinical electromyographic studies of canine X-linked muscular dystrophy*. Am J Vet Res, 1989. **50**(12): p. 2145-7.
144. DeSilva, S., et al., *Prednisone treatment in Duchenne muscular dystrophy. Long-term benefit*. Arch Neurol, 1987. **44**(8): p. 818-22.
145. Drachman, D.B., K.V. Toyka, and E. Myer, *Prednisone in Duchenne muscular dystrophy*. Lancet, 1974. **2**(7894): p. 1409-12.
146. Anderson, J.E., L.M. McIntosh, and R. Poettcker, *Deflazacort but not prednisone improves both muscle repair and fiber growth in diaphragm and limb muscle in vivo in the mdx dystrophic mouse*. Muscle Nerve, 1996. **19**(12): p. 1576-85.
147. Anderson, J.E. and C. Vargas, *Correlated NOS-1mu and myf5 expression by satellite cells in mdx mouse muscle regeneration during NOS manipulation and deflazacort treatment*. Neuromuscul Disord, 2003. **13**(5): p. 388-96.
148. Anderson, J.E., M. Weber, and C. Vargas, *Deflazacort increases laminin expression and myogenic repair, and induces early persistent functional gain in mdx mouse muscular dystrophy*. Cell Transplant, 2000. **9**(4): p. 551-64.
149. Bonifati, M.D., et al., *A multicenter, double-blind, randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne muscular dystrophy*. Muscle Nerve, 2000. **23**(9): p. 1344-7.
150. Mesa, L.E., et al., *Steroids in Duchenne muscular dystrophy--deflazacort trial*. Neuromuscul Disord, 1991. **1**(4): p. 261-6.
151. Manzur, A.Y., et al., *Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy*. Cochrane Database Syst Rev, 2004(2): p. CD003725.
152. Manzur, A.Y., et al., *Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy*. Cochrane Database Syst Rev, 2008(1): p. CD003725.
153. Barton-Davis, E.R., et al., *Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice*. J Clin Invest, 1999. **104**(4): p. 375-81.
154. Palmer, E., J.M. Wilhelm, and F. Sherman, *Phenotypic suppression of nonsense mutants in yeast by aminoglycoside antibiotics*. Nature, 1979. **277**(5692): p. 148-50.
155. Wilton, S., *PTC124, nonsense mutations and Duchenne muscular dystrophy*. Neuromuscul Disord, 2007. **17**(9-10): p. 719-20.
156. Welch, E.M., et al., *PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations*. Nature, 2007. **447**(7140): p. 87-91.

157. Bogdanovich, S., et al., *Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade*. Nature, 2002. **420**(6914): p. 418-21.
158. Bogdanovich, S., et al., *Myostatin propeptide-mediated amelioration of dystrophic pathophysiology*. FASEB J, 2005. **19**(6): p. 543-9.
159. Khurana, T.S. and K.E. Davies, *Pharmacological strategies for muscular dystrophy*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(5): p. 379-90.
160. Joulia, D., et al., *Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin*. Exp Cell Res, 2003. **286**(2): p. 263-75.
161. Taylor, W.E., et al., *Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **280**(2): p. E221-8.
162. Thomas, M., et al., *Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation*. J Biol Chem, 2000. **275**(51): p. 40235-43.
163. Amthor, H., et al., *Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis*. Dev Biol, 2004. **270**(1): p. 19-30.
164. Hill, J.J., et al., *The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum*. J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 40735-41.
165. Kambadur, R., et al., *Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle*. Genome Res, 1997. **7**(9): p. 910-6.
166. McPherron, A.C., A.M. Lawler, and S.J. Lee, *Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member*. Nature, 1997. **387**(6628): p. 83-90.
167. McPherron, A.C. and S.J. Lee, *Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(23): p. 12457-61.
168. Schuelke, M., et al., *Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child*. N Engl J Med, 2004. **350**(26): p. 2682-8.
169. Wagner, K.R., et al., *Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice*. Ann Neurol, 2002. **52**(6): p. 832-6.
170. Benabdallah, B.F., et al., *Inhibiting myostatin with follistatin improves the success of myoblast transplantation in dystrophic mice*. Cell Transplant, 2008. **17**(3): p. 337-50.
171. Jeuge-Maynard, I., et al., *Le Petit Larousse 2008 sur CD-ROM*, Larousse, Editor. 2008.
172. Goyenvallé, A., et al., *Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping*. Science, 2004. **306**(5702): p. 1796-9.
173. Phelps, S.F., et al., *Expression of full-length and truncated dystrophin mini-genes in transgenic mdx mice*. Hum Mol Genet, 1995. **4**(8): p. 1251-8.
174. Blankinship, M.J., et al., *Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6*. Mol Ther, 2004. **10**(4): p. 671-8.
175. Wang, Z., et al., *Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(3): p. 321-8.
176. Gregorevic, P., et al., *Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 828-34.
177. Li, H.H., et al., *[Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin gene SMCKA3999 effectively ameliorates dystrophic pathology in mdx model mice]*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2003. **83**(17): p. 1513-6.

178. Wang, B., J. Li, and X. Xiao, *Adeno-associated virus vector carrying human mini-dystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13714-9.
179. Watchko, J., et al., *Adeno-associated virus vector-mediated minidystrophin gene therapy improves dystrophic muscle contractile function in mdx mice*. Hum Gene Ther, 2002. **13**(12): p. 1451-60.
180. Muruve, D.A., et al., *Adenoviral gene therapy leads to rapid induction of multiple chemokines and acute neutrophil-dependent hepatic injury in vivo*. Hum Gene Ther, 1999. **10**(6): p. 965-76.
181. Muruve, D.A., et al., *Helper-dependent adenovirus vectors elicit intact innate but attenuated adaptive host immune responses in vivo*. J Virol, 2004. **78**(11): p. 5966-72.
182. Dunckley, M.G., et al., *Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides*. Hum Mol Genet, 1998. **7**(7): p. 1083-90.
183. Wilton, S.D., D.E. Dye, and N.G. Laing, *Dystrophin gene transcripts skipping the mdx mutation*. Muscle Nerve, 1997. **20**(6): p. 728-34.
184. Good, L., *Translation repression by antisense sequences*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(5): p. 854-61.
185. Kole, R. and P. Sazani, *Antisense effects in the cell nucleus: modification of splicing*. Curr Opin Mol Ther, 2001. **3**(3): p. 229-34.
186. Wilton, S.D. and S. Fletcher, *Modification of pre-mRNA processing: application to dystrophin expression*. Curr Opin Mol Ther, 2006. **8**(2): p. 130-5.
187. Alter, J., et al., *Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology*. Nat Med, 2006. **12**(2): p. 175-7.
188. Lu, Q.L., et al., *Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse*. Nat Med, 2003. **9**(8): p. 1009-14.
189. Sirsi, S.R., J.H. Williams, and G.J. Lutz, *Poly(ethylene imine)-poly(ethylene glycol) copolymers facilitate efficient delivery of antisense oligonucleotides to nuclei of mature muscle cells of mdx mice*. Hum Gene Ther, 2005. **16**(11): p. 1307-17.
190. Williams, J.H., et al., *Induction of dystrophin expression by exon skipping in mdx mice following intramuscular injection of antisense oligonucleotides complexed with PEG-PEI copolymers*. Mol Ther, 2006. **14**(1): p. 88-96.
191. Lu, Q.L., et al., *Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(1): p. 198-203.
192. Kang, H., et al., *Cellular Delivery and Biological Activity of Antisense Oligonucleotides Conjugated to a Targeted Protein Carrier*. Bioconjug Chem, 2008.
193. Wu, B., et al., *Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(39): p. 14814-9.
194. Rando, T.A., *Non-viral gene therapy for Duchenne muscular dystrophy: progress and challenges*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1772**(2): p. 263-71.
195. Bertoni, C., G.E. Morris, and T.A. Rando, *Strand bias in oligonucleotide-mediated dystrophin gene editing*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(2): p. 221-33.

196. Bertoni, C. and T.A. Rando, *Dystrophin gene repair in mdx muscle precursor cells in vitro and in vivo mediated by RNA-DNA chimeric oligonucleotides*. Hum Gene Ther, 2002. **13**(6): p. 707-18.
197. Rando, T.A., M.H. Disatnik, and L.Z. Zhou, *Rescue of dystrophin expression in mdx mouse muscle by RNA/DNA oligonucleotides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5363-8.
198. Bhagavati, S., *Stem cell based therapy for skeletal muscle diseases*. Curr Stem Cell Res Ther, 2008. **3**(3): p. 219-28.
199. Gates, C.B., et al., *Regenerative medicine for the musculoskeletal system based on muscle-derived stem cells*. J Am Acad Orthop Surg, 2008. **16**(2): p. 68-76.
200. Peault, B., et al., *Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy*. Mol Ther, 2007. **15**(5): p. 867-77.
201. Berry, S.E., et al., *Multipotential mesoangioblast stem cell therapy in the mdx/utrn-/- mouse model for Duchenne muscular dystrophy*. Regen Med, 2007. **2**(3): p. 275-88.
202. Belles-Isles, M., et al., *Rapid selection of donor myoblast clones for muscular dystrophy therapy using cell surface expression of NCAM*. Eur J Histochem, 1993. **37**(4): p. 375-80.
203. Partridge, T.A., et al., *Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts*. Nature, 1989. **337**(6203): p. 176-9.
204. Skuk, D. and J.P. Tremblay, *Cell therapies for inherited myopathies*. Curr Opin Rheumatol, 2003. **15**(6): p. 723-9.
205. Lipton, B.H. and E. Schultz, *Developmental fate of skeletal muscle satellite cells*. Science, 1979. **205**(4412): p. 1292-4.
206. Agbulut, O., et al., *Comparison of human skeletal myoblasts and bone marrow-derived CD133+ progenitors for the repair of infarcted myocardium*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(2): p. 458-63.
207. Dinsmore, J.H. and N. Dib, *An overview of myoblast transplantation for myocardial regeneration*. Am Heart Hosp J, 2005. **3**(3): p. 146-52.
208. Menasche, P., *Skeletal myoblast transplantation for cardiac repair*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2004. **2**(1): p. 21-8.
209. Benabdallah, B.F., M. Bouchentouf, and J.P. Tremblay, *Improved success of myoblast transplantation in mdx mice by blocking the myostatin signal*. Transplantation, 2005. **79**(12): p. 1696-702.
210. Bae, G.U., et al., *Regulation of myoblast motility and fusion by the CXCR4-associated sialomucin, CD164*. J Biol Chem, 2008. **283**(13): p. 8301-9.
211. Forde, S., et al., *Endolyn (CD164) modulates the CXCL12-mediated migration of umbilical cord blood CD133+ cells*. Blood, 2007. **109**(5): p. 1825-33.
212. Quenneville, S.P., et al., *Autologous transplantation of muscle precursor cells modified with a lentivirus for muscular dystrophy: human cells and primate models*. Mol Ther, 2007. **15**(2): p. 431-8.
213. Quenneville, S.P., et al., *Dystrophin expression in host muscle following transplantation of muscle precursor cells modified with the phiC31 integrase*. Gene Ther, 2007. **14**(6): p. 514-22.
214. Bouchentouf, M., B.F. Benabdallah, and J.P. Tremblay, *Myoblast survival enhancement and transplantation success improvement by heat-shock treatment in mdx mice*. Transplantation, 2004. **77**(9): p. 1349-56.

215. Azarnoush, K., et al., *Enhancement of the functional benefits of skeletal myoblast transplantation by means of coadministration of hypoxia-inducible factor 1alpha*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2005. **130**(1): p. 173-9.
216. Li, X., et al., *Effects of hypoxia on proliferation and differentiation of myoblasts*. Med Hypotheses, 2007. **69**(3): p. 629-36.
217. Lafreniere, J.F., et al., *Interleukin-4 improves the migration of human myogenic precursor cells in vitro and in vivo*. Exp Cell Res, 2006. **312**(7): p. 1127-41.
218. Lafreniere, J.F., et al., *Growth factors improve the in vivo migration of human skeletal myoblasts by modulating their endogenous proteolytic activity*. Transplantation, 2004. **77**(11): p. 1741-7.
219. Bouchentouf, M., et al., *Exercise improves the success of myoblast transplantation in mdx mice*. Neuromuscul Disord, 2006. **16**(8): p. 518-29.
220. Etzion, S., et al., *Cellular cardiomyoplasty of cardiac fibroblasts by adenoviral delivery of MyoD ex vivo: an unlimited source of cells for myocardial repair*. Circulation, 2002. **106**(12 Suppl 1): p. 1125-30.
221. Seale, P., et al., *Pax7 is necessary and sufficient for the myogenic specification of CD45+:Scal+ stem cells from injured muscle*. PLoS Biol, 2004. **2**(5): p. E130.
222. McKinnell, I.W., et al., *Pax7 activates myogenic genes by recruitment of a histone methyltransferase complex*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(1): p. 77-84.
223. Price, F.D., K. Kuroda, and M.A. Rudnicki, *Stem cell based therapies to treat muscular dystrophy*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1772**(2): p. 272-83.
224. Skuk, D., et al., *Efficacy of myoblast transplantation in nonhuman primates following simple intramuscular cell injections: toward defining strategies applicable to humans*. Exp Neurol, 2002. **175**(1): p. 112-26.
225. Skuk, D., et al., *Dystrophin expression in myofibers of Duchenne muscular dystrophy patients following intramuscular injections of normal myogenic cells*. Mol Ther, 2004. **9**(3): p. 475-82.
226. Fan, Y., et al., *Rapid death of injected myoblasts in myoblast transfer therapy*. Muscle Nerve, 1996. **19**(7): p. 853-60.
227. Sammels, L.M., et al., *Innate inflammatory cells are not responsible for early death of donor myoblasts after myoblast transfer therapy*. Transplantation, 2004. **77**(12): p. 1790-7.
228. Beauchamp, J.R., et al., *Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source*. J Cell Biol, 1999. **144**(6): p. 1113-22.
229. Bouchentouf, M., et al., *Vascular endothelial growth factor reduced hypoxia-induced death of human myoblasts and improved their engraftment in mouse muscles*. Gene Ther, 2008. **15**(6): p. 404-14.
230. Skuk, D., et al., *Ischemic central necrosis in pockets of transplanted myoblasts in nonhuman primates: implications for cell-transplantation strategies*. Transplantation, 2007. **84**(10): p. 1307-15.
231. Bouchentouf, M., et al., *Induction of Anoikis following myoblast transplantation into SCID mouse muscles requires the Bit1 and FADD pathways*. Am J Transplant, 2007. **7**(6): p. 1491-505.
232. Suzuki, K., et al., *Heat shock treatment enhances graft cell survival in skeletal myoblast transplantation to the heart*. Circulation, 2000. **102**(19 Suppl 3): p. III216-21.

233. Li, X., et al., [Role of HIF signaling pathway involved in effects of hypoxia on proliferation and differentiation of myoblasts]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, 2007. **38**(3): p. 224-8.
234. Skuk, D., et al., *Dynamics of the early immune cellular reactions after myogenic cell transplantation*. *Cell Transplant*, 2002. **11**(7): p. 671-81.
235. Vilquin, J.T., et al., *Successful histocompatible myoblast transplantation in dystrophin-deficient mdx mouse despite the production of antibodies against dystrophin*. *J Cell Biol*, 1995. **131**(4): p. 975-88.
236. Biancheri, R., et al., *POMT2 gene mutation in limb-girdle muscular dystrophy with inflammatory changes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **363**(4): p. 1033-7.
237. Bione, S., et al., *Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy*. *Nat Genet*, 1994. **8**(4): p. 323-7.
238. Bonne, G., et al., *Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy*. *Nat Genet*, 1999. **21**(3): p. 285-8.
239. Brais, B., *Oculopharyngeal muscular dystrophy: a late-onset polyalanine disease*. *Cytogenet Genome Res*, 2003. **100**(1-4): p. 252-60.
240. Brais, B., et al., *The oculopharyngeal muscular dystrophy locus maps to the region of the cardiac alpha and beta myosin heavy chain genes on chromosome 14q11.2-q13*. *Hum Mol Genet*, 1995. **4**(3): p. 429-34.
241. Cho, D.H. and S.J. Tapscott, *Myotonic dystrophy: emerging mechanisms for DMI and DM2*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1772**(2): p. 195-204.
242. Clement, E.M., et al., *Mild POMGnT1 mutations underlie a novel limb-girdle muscular dystrophy variant*. *Arch Neurol*, 2008. **65**(1): p. 137-41.
243. Eisenberg, I., et al., *The UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy*. *Nat Genet*, 2001. **29**(1): p. 83-7.
244. Ellis, J.A., *Emery-Dreifuss muscular dystrophy at the nuclear envelope: 10 years on*. *Cell Mol Life Sci*, 2006. **63**(23): p. 2702-9.
245. Emery, A.E. and F.E. Dreifuss, *Unusual type of benign x-linked muscular dystrophy*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1966. **29**(4): p. 338-42.
246. Fan, X. and G.A. Rouleau, *Progress in understanding the pathogenesis of oculopharyngeal muscular dystrophy*. *Can J Neurol Sci*, 2003. **30**(1): p. 8-14.
247. Flanigan, K.M., et al., *Genetic characterization of a large, historically significant Utah kindred with facioscapulohumeral dystrophy*. *Neuromuscul Disord*, 2001. **11**(6-7): p. 525-9.
248. Freund, A.A., et al., *Duchenne and Becker muscular dystrophy: a molecular and immunohistochemical approach*. *Arq Neuropsiquiatr*, 2007. **65**(1): p. 73-6.
249. Guglieri, M., et al., *Clinical, molecular, and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed Italian limb girdle muscular dystrophy patients*. *Hum Mutat*, 2008. **29**(2): p. 258-66.
250. Higashi, K., et al., *Abnormal expression of proteoglycans in Ullrich's disease with collagen VI deficiency*. *Muscle Nerve*, 2006. **33**(1): p. 120-6.
251. Hoffman, E.P., et al., *Cell and fiber-type distribution of dystrophin*. *Neuron*, 1988. **1**(5): p. 411-20.
252. Illarioshkin, S.N., et al., *Identical dysferlin mutation in limb-girdle muscular dystrophy type 2B and distal myopathy*. *Neurology*, 2000. **55**(12): p. 1931-3.

253. Jimenez-Mallebrera, C., et al., *Congenital muscular dystrophy: molecular and cellular aspects*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(7-8): p. 809-23.
254. Lisi, M.T. and R.D. Cohn, *Congenital muscular dystrophies: new aspects of an expanding group of disorders*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1772**(2): p. 159-72.
255. Machuca-Tzili, L., D. Brook, and D. Hilton-Jones, *Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review*. Muscle Nerve, 2005. **32**(1): p. 1-18.
256. Mankodi, A., et al., *Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy*. Mol Cell, 2002. **10**(1): p. 35-44.
257. Mankodi, A., et al., *Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(19): p. 2165-70.
258. Mastaglia, F.L. and N.G. Laing, *Distal myopathies: clinical and molecular diagnosis and classification*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1999. **67**(6): p. 703-7.
259. Mathieu, J., M. De Braekeleer, and C. Prevost, *Genealogical reconstruction of myotonic dystrophy in the Saguenay-Lac-Saint-Jean area (Quebec, Canada)*. Neurology, 1990. **40**(5): p. 839-42.
260. Monaco, A.P., et al., *An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus*. Genomics, 1988. **2**(1): p. 90-5.
261. van der Maarel, S.M., R.R. Frants, and G.W. Padberg, *Facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1772**(2): p. 186-94.
262. Zerylnick, C., et al., *Normal variation at the myotonic dystrophy locus in global human populations*. Am J Hum Genet, 1995. **56**(1): p. 123-30.
263. Tawil, R. and S.M. Van Der Maarel, *Facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Muscle Nerve, 2006. **34**(1): p. 1-15.
264. Abu-Baker, A. and G.A. Rouleau, *Oculopharyngeal muscular dystrophy: recent advances in the understanding of the molecular pathogenic mechanisms and treatment strategies*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1772**(2): p. 173-85.
265. Penisson-Besnier, I., *[Distal myopathies]*. Rev Neurol (Paris), 2004. **160**(2): p. 211-6.
266. Laing, N.G., et al., *Autosomal dominant distal myopathy: linkage to chromosome 14*. Am J Hum Genet, 1995. **56**(2): p. 422-7.
267. Scoppetta, C., et al., *Infantile autosomal dominant distal myopathy*. Acta Neurol Scand, 1995. **92**(2): p. 122-6.
268. Helbling-Leclerc, A., et al., *Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy*. Nat Genet, 1995. **11**(2): p. 216-8.
269. Hillaire, D., et al., *Localization of merosin-negative congenital muscular dystrophy to chromosome 6q2 by homozygosity mapping*. Hum Mol Genet, 1994. **3**(9): p. 1657-61.
270. Martin, P.T., *Mechanisms of disease: congenital muscular dystrophies-glycosylation takes center stage*. Nat Clin Pract Neurol, 2006. **2**(4): p. 222-30.
271. Benjamini, E., R. Coico, and G. Sunshine, *Immunology : a short course*. 4th ed. 2000, New York, NY ; Toronto: John Wiley & Sons. xxix, 498 p.
272. Goldsby, R.A., *Immunology*. 5th ed. 2003, New York: W.H. Freeman. xxiii, 549, [56] p.
273. Goldsby, R.A., et al., *Immunologie : le cours de Janis Kuby : avec questions de révision*. Sciences SUP. Sciences de la vie. 2001, Paris: Dunod. xxvii, 660 p.

274. Janeway, C., *Immunobiology : the immune system in health and disease*. 6th ed. 2005, New York: Garland Science : Churchill Livingstone. xxiii, 823 p.
275. Murphy, K.P., et al., *Janeway's immunobiology*. 7th ed. 2008, New York: Garland Science. xxi, 887 p.
276. Beguin, Y., [*Hematopoietic stem cell transplantation ("Bone marrow graft"): indications, methods and risks*]. *Rev Med Liege*, 1996. **51**(4): p. 270-5.
277. Philip, A.T. and B. Gerson, *Toxicology and adverse effects of drugs used for immunosuppression in organ transplantation*. *Clin Lab Med*, 1998. **18**(4): p. 755-65.
278. McCauley, J., *The nephrotoxicity of FK506 as compared with cyclosporine*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1993. **2**(4): p. 662-9.
279. Klintmalm, G.B. and T.A. Gonwa, *Nephrotoxicity associated with cyclosporine and FK506*. *Liver Transpl Surg*, 1995. **1**(5 Suppl 1): p. 11-9.
280. Wijdsicks, E.F., et al., *FK506-induced neurotoxicity in liver transplantation*. *Ann Neurol*, 1994. **35**(4): p. 498-501.
281. Neu, A.M., et al., *Evaluation of neurotoxicity in pediatric renal transplant recipients treated with tacrolimus (FK506)*. *Clin Transplant*, 1997. **11**(5 Pt 1): p. 412-4.
282. Pratt, W.B., et al., *Chaperoning of glucocorticoid receptors*. *Handb Exp Pharmacol*, 2006(172): p. 111-38.
283. Buckingham, J.C., *Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking*. *Br J Pharmacol*, 2006. **147 Suppl 1**: p. S258-68.
284. Tomkinson, A.E., et al., *DNA ligases: structure, reaction mechanism, and function*. *Chem Rev*, 2006. **106**(2): p. 687-99.
285. McDonough, A.K., J.R. Curtis, and K.G. Saag, *The epidemiology of glucocorticoid-associated adverse events*. *Curr Opin Rheumatol*, 2008. **20**(2): p. 131-7.
286. Garcia Dadoni, L. and M. Rafael Seoane, [*Toxicity and side effects of cyclophosphamide*]. *Rev Clin Esp*, 1968. **109**(1): p. 11-6.
287. Hussey, J.L. and W.A. Kiskan, *Amelioration of the side effects of cyclophosphamide*. *Surg Forum*, 1970. **21**: p. 109-11.
288. Nissen-Meyer, R. and H. Host, [*Hematological side-effects of cyclophosphamide*]. *Nord Med*, 1961. **66**: p. 1296-8.
289. Verweij, J. and G. Stoter, *Severe side effects of the cytotoxic drug mitomycin-C*. *Neth J Med*, 1987. **30**(1-2): p. 43-50.
290. Zachariae, H., *Methotrexate side-effects*. *Br J Dermatol*, 1990. **122 Suppl 36**: p. 127-33.
291. Martin, F., et al., *Side-effects of intravenous cyclophosphamide pulse therapy*. *Lupus*, 1997. **6**(3): p. 254-7.
292. Sitzia, J. and L. Huggins, *Side effects of cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil (CMF) chemotherapy for breast cancer*. *Cancer Pract*, 1998. **6**(1): p. 13-21.
293. Gilbert, C., *Clinical uses of anti-thymocyte globulin (ATGAM), Part II*. *N C Med J*, 1984. **45**(12): p. 773-5.
294. Gilbert, C., *Clinical uses of anti-thymocyte globulin (ATGAM), Part I*. *N C Med J*, 1984. **45**(11): p. 737-9.
295. Wechter, W.J., et al., *Manufacture of antithymocyte globulin (ATGAM) for clinical trials*. *Transplantation*, 1979. **28**(4): p. 303-7.

296. Regan, J., et al., *Characterization of anti-thymoglobulin, anti-Atgam and anti-OKT3 IgG antibodies in human serum with an 11-min ELISA*. *Transpl Immunol*, 1997. **5**(1): p. 49-56.
297. Tchervenkov, J., et al., *Use of thymoglobulin induction therapy in the prevention of acute graft rejection episodes following liver transplantation*. *Transplant Proc*, 1997. **29**(7A): p. 13S-15S.
298. Tesi, R.J., et al., *Thymoglobulin reverses acute renal allograft rejection better than ATGAM--a double-blinded randomized clinical trial*. *Transplant Proc*, 1997. **29**(7A): p. 21S-23S.
299. Timm, M.M., et al., *Thymoglobulin targets multiple plasma cell antigens and has in vitro and in vivo activity in multiple myeloma*. *Leukemia*, 2006. **20**(10): p. 1863-9.
300. Horina, J.H., et al., *OKT3 monoclonal antibody therapy and visual loss*. *Nephrol Dial Transplant*, 1996. **11**(7): p. 1497-8.
301. Smith, S.L., *Ten years of Orthoclone OKT3 (muromonab-CD3): a review*. *J Transpl Coord*, 1996. **6**(3): p. 109-19; quiz 120-1.
302. Zibari, G.B., et al., *OKT3 induction therapy: influence of duration on rejections and infections*. *Clin Transplant*, 1996. **10**(6 Pt 2): p. 614-6.
303. Bell, J. and J. Colaneri, *Basiliximab (Simulect): simplifying induction therapy*. *Nephrol Nurs J*, 2000. **27**(2): p. 243-4.
304. Hinduja, A., et al., *An early experience with Simulect (basiliximab): an IL-2 receptor antibody*. *Transplant Proc*, 2000. **32**(7): p. 1739-40.
305. Kreijveld, E., et al., *Following anti-CD25 treatment, a functional CD4+CD25+ regulatory T-cell pool is present in renal transplant recipients*. *Am J Transplant*, 2007. **7**(1): p. 249-55.
306. Vincenti, F., *What's in the pipeline? New immunosuppressive drugs in transplantation*. *Am J Transplant*, 2002. **2**(10): p. 898-903.
307. Thomson, A.W. and I.D. Cameron, *Immune suppression with cyclosporin A--optimism and caution*. *Scott Med J*, 1981. **26**(2): p. 139-44.
308. Kozłowska, I., J. Rozanski, and K. Ciechanowski, *[Neurotoxicity of cyclosporine]*. *Wiad Lek*, 2006. **59**(7-8): p. 516-20.
309. Johnson, H.M. and J.E. Blalock, *Interferon immunosuppression: mediation by a suppressor factor*. *Infect Immun*, 1980. **29**(2): p. 301-5.
310. Gummert, J.F., T. Ikonen, and R.E. Morris, *Newer immunosuppressive drugs: a review*. *J Am Soc Nephrol*, 1999. **10**(6): p. 1366-80.
311. Cezard, J.P., et al., *A prospective study of the efficacy and tolerance of a chimeric antibody to tumor necrosis factors (remicade) in severe pediatric crohn disease*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2003. **36**(5): p. 632-6.
312. Young, M. and G.L. Plosker, *Mycophenolate mofetil: a pharmacoeconomic review of its use in solid organ transplantation*. *Pharmacoeconomics*, 2002. **20**(10): p. 675-713.
313. Zolezzi, M., *Mycophenolate Sodium versus Mycophenolate Mofetil: A Review of Their Comparative Features*. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 2005. **16**(2): p. 140-5.
314. Nagaoka, Y., et al., *Effects of phosphorylation of immunomodulatory agent FTY720 (fingolimod) on antiproliferative activity against breast and colon cancer cells*. *Biol Pharm Bull*, 2008. **31**(6): p. 1177-81.

315. Suzuki, S., et al., *A novel immunosuppressant, FTY720, with a unique mechanism of action, induces long-term graft acceptance in rat and dog allotransplantation*. *Transplantation*, 1996. **61**(2): p. 200-5.
316. Billingham, R.E., L. Brent, and P.B. Medawar, *Quantitative studies on tissue transplantation immunity. II. The origin, strength and duration of actively and adoptively acquired immunity*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1954. **143**(910): p. 58-80.
317. Billingham, R.E., et al., *Quantitative studies on tissue transplantation immunity. I. The survival times of skin homografts exchanged between members of different inbred strains of mice*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1954. **143**(910): p. 43-58.
318. Brent, L., J. Brown, and P.B. Medawar, *Skin transplantation immunity in relation to hypersensitivity*. *Lancet*, 1958. **2**(7046): p. 561-4.
319. Medawar, P.B., *The immunology of transplantation*. Harvey Lect, 1956(Series 52): p. 144-76.
320. Fehr, T. and M. Sykes, *Tolerance induction in clinical transplantation*. *Transpl Immunol*, 2004. **13**(2): p. 117-30.
321. Elwood, E.T., et al., *Microchimerism and rejection in clinical transplantation*. *Lancet*, 1997. **349**(9062): p. 1358-60.
322. Schlitt, H.J., et al., *Donor-type microchimerism associated with graft rejection eight years after liver transplantation*. *N Engl J Med*, 1994. **330**(9): p. 646-7.
323. Saidman, S.L., *Mixed chimerism approach to induction of transplant tolerance: a review of the Massachusetts General Hospital experience*. *Transplant Proc*, 2007. **39**(3): p. 676-7.
324. Sykes, M., *Mixed chimerism and transplant tolerance*. *Immunity*, 2001. **14**(4): p. 417-24.
325. Tomita, Y., et al., *Induction of permanent mixed chimerism and skin allograft tolerance across fully MHC-mismatched barriers by the additional myelosuppressive treatments in mice primed with allogeneic spleen cells followed by cyclophosphamide*. *J Immunol*, 2000. **165**(1): p. 34-41.
326. Mayumi, H. and R.A. Good, *Induction of tolerance across major barriers using a two-step method with genetic analysis of tolerance induction*. *Immunobiology*, 1989. **179**(1): p. 86-108.
327. de Vries-van der Zwan, A., et al., *An alternative conditioning regimen for induction of specific skin graft tolerance across full major histocompatibility complex barriers*. *Transpl Immunol*, 1998. **6**(3): p. 147-51.
328. Pan, Y., et al., *Blockade of the CD40/CD154 pathway enhances T-cell-depleted allogeneic bone marrow engraftment under nonmyeloablative and irradiation-free conditioning therapy*. *Transplantation*, 2003. **76**(1): p. 216-24.
329. Latini, P., *[Bone marrow transplantation with T-cell depletion and hyperfractionated whole-body irradiation. The radiobiological and clinical correlations]*. *Radiol Med (Torino)*, 1992. **83**(4): p. 445-52.
330. Nikolic, B., A. Khan, and M. Sykes, *Induction of tolerance by mixed chimerism with nonmyeloblastic host conditioning: the importance of overcoming intrathymic alloresistance*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2001. **7**(3): p. 144-53.
331. Wekerle, T. and M. Sykes, *Mixed chimerism as an approach for the induction of transplantation tolerance*. *Transplantation*, 1999. **68**(4): p. 459-67.

332. Sharabi, Y. and D.H. Sachs, *Engraftment of allogeneic bone marrow following administration of anti-T cell monoclonal antibodies and low-dose irradiation*. *Transplant Proc*, 1989. **21**(1 Pt 1): p. 233-5.
333. Lebranchu, Y., *Tolérance, aspects théoriques et cliniques : implications pour la transplantation*. *Actualités néphrologiques*, 2004: p. 283-99.
334. Starzl, T.E. and R.M. Zinkernagel, *Transplantation tolerance from a historical perspective*. *Nat Rev Immunol*, 2001. **1**(3): p. 233-9.
335. Duvivier-Kali, V.F., et al., *Complete protection of islets against allorejection and autoimmunity by a simple barium-alginate membrane*. *Diabetes*, 2001. **50**(8): p. 1698-705.
336. Schwartz, R.H., *Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism?* *J Exp Med*, 1996. **184**(1): p. 1-8.
337. Lin, H., et al., *Long-term acceptance of major histocompatibility complex mismatched cardiac allografts induced by CTLA4Ig plus donor-specific transfusion*. *J Exp Med*, 1993. **178**(5): p. 1801-6.
338. Yamada, A., et al., *Long-term acceptance of major histocompatibility complex-mismatched cardiac allograft induced by a low dose of CTLA4IgM plus FK506*. *Microbiol Immunol*, 1996. **40**(7): p. 513-8.
339. Larsen, C.P., et al., *Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways*. *Nature*, 1996. **381**(6581): p. 434-8.
340. Sloan-Lancaster, J., T.H. Steinberg, and P.M. Allen, *Selective activation of the calcium signaling pathway by altered peptide ligands*. *J Exp Med*, 1996. **184**(4): p. 1525-30.
341. Petschner, F., et al., *Constitutive expression of Bcl-xL or Bcl-2 prevents peptide antigen-induced T cell deletion but does not influence T cell homeostasis after a viral infection*. *Eur J Immunol*, 1998. **28**(2): p. 560-9.
342. Lechler, R.I., O.A. Garden, and L.A. Turka, *The complementary roles of deletion and regulation in transplantation tolerance*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(2): p. 147-58.
343. Li, X.C., et al., *The role of T cell apoptosis in transplantation tolerance*. *Curr Opin Immunol*, 2000. **12**(5): p. 522-7.
344. Gershon, R.K. and K. Kondo, *Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes*. *Immunology*, 1970. **18**(5): p. 723-37.
345. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. *J Immunol*, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
346. Wood, K.J. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells in transplantation tolerance*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(3): p. 199-210.
347. Baldwin, T.A., K.A. Hogquist, and S.C. Jameson, *The fourth way? Harnessing aggressive tendencies in the thymus*. *J Immunol*, 2004. **173**(11): p. 6515-20.
348. Keir, M.E. and A.H. Sharpe, *The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity*. *Immunol Rev*, 2005. **204**: p. 128-43.
349. Malek, T.R., et al., *CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2*. *Immunity*, 2002. **17**(2): p. 167-78.

350. Nakamura, K., et al., *TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice.* J Immunol, 2004. **172**(2): p. 834-42.
351. Paust, S. and H. Cantor, *Regulatory T cells and autoimmune disease.* Immunol Rev, 2005. **204**: p. 195-207.
352. Jonuleit, H. and E. Schmitt, *The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations.* J Immunol, 2003. **171**(12): p. 6323-7.
353. Gilliet, M. and Y.J. Liu, *Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells.* J Exp Med, 2002. **195**(6): p. 695-704.
354. Zhang, Z.X., et al., *Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression.* Nat Med, 2000. **6**(7): p. 782-9.
355. Hara, M., et al., *IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo.* J Immunol, 2001. **166**(6): p. 3789-96.
356. Josien, R., et al., *A critical role for transforming growth factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance.* J Clin Invest, 1998. **102**(11): p. 1920-6.
357. Asano, M., et al., *Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation.* J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 387-96.
358. Lim, H.W., et al., *Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells.* J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4180-3.
359. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production.* J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 287-96.
360. Piccirillo, C.A. and E.M. Shevach, *Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells.* J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1137-40.
361. Ghiringhelli, F., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner.* J Exp Med, 2005. **202**(8): p. 1075-85.
362. Azuma, T., et al., *Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions.* Cancer Res, 2003. **63**(15): p. 4516-20.
363. Misra, N., et al., *Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells.* J Immunol, 2004. **172**(8): p. 4676-80.
364. Levings, M.K., R. Sangregorio, and M.G. Roncarolo, *Human cd25(+)/cd4(+) T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function.* J Exp Med, 2001. **193**(11): p. 1295-302.
365. Suvas, S., et al., *CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses.* J Exp Med, 2003. **198**(6): p. 889-901.
366. Somerset, D.A., et al., *Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset.* Immunology, 2004. **112**(1): p. 38-43.
367. Pakravan, N., A.T. Hassan, and Z.M. Hassan, *Naturally occurring self-reactive CD4+CD25+ regulatory T cells: universal immune code.* Cell Mol Immunol, 2007. **4**(3): p. 197-201.
368. Wang, H.Y., et al., *Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy.* Immunity, 2004. **20**(1): p. 107-18.
369. Wang, R.F., *Immune suppression by tumor-specific CD4+ regulatory T-cells in cancer.* Semin Cancer Biol, 2006. **16**(1): p. 73-9.

370. Karim, M., et al., *CD25+CD4+ regulatory T cells generated by exposure to a model protein antigen prevent allograft rejection: antigen-specific reactivation in vivo is critical for bystander regulation*. Blood, 2005. **105**(12): p. 4871-7.
371. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific*. J Immunol, 2000. **164**(1): p. 183-90.
372. Joffre, O., et al., *Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+CD25+ T lymphocytes*. Blood, 2004. **103**(11): p. 4216-21.
373. O'Garra, A. and P. Vieira, *Regulatory T cells and mechanisms of immune system control*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 801-5.
374. Sakaguchi, S., *Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 531-62.
375. Miyara, M. and S. Sakaguchi, *Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression*. Trends Mol Med, 2007. **13**(3): p. 108-16.
376. Fallarino, F., et al., *The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells*. J Immunol, 2006. **176**(11): p. 6752-61.
377. Grossman, W.J., et al., *Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 589-601.
378. Waldmann, H. and S. Cobbold, *Regulating the immune response to transplants. a role for CD4+ regulatory cells?* Immunity, 2001. **14**(4): p. 399-406.
379. Zhai, Y. and J.W. Kupiec-Weglinski, *What is the role of regulatory T cells in transplantation tolerance?* Curr Opin Immunol, 1999. **11**(5): p. 497-503.
380. Cohen, J.L., et al., *CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease*. J Exp Med, 2002. **196**(3): p. 401-6.
381. Hoffmann, P., et al., *Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation*. J Exp Med, 2002. **196**(3): p. 389-99.
382. Taylor, P.A., C.J. Lees, and B.R. Blazar, *The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3493-9.
383. Elkord, E., *Role of regulatory T cells in allergy: implications for therapeutic strategy*. Inflamm Allergy Drug Targets, 2006. **5**(4): p. 211-7.
384. Foley, S.C., et al., *Images in allergy and immunology: regulatory T cells in allergic disease*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(2): p. 482-6.
385. Larche, M., *Regulatory T cells in allergy and asthma*. Chest, 2007. **132**(3): p. 1007-14.
386. Taylor, A., et al., *T regulatory cells and allergy*. Microbes Infect, 2005. **7**(7-8): p. 1049-55.
387. Wing, K. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells as potential immunotherapy in allergy*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2006. **6**(6): p. 482-8.
388. Wu, K., et al., *IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy*. Cell Mol Immunol, 2007. **4**(4): p. 269-75.
389. Barnett, B.G., et al., *Regulatory T cells: a new frontier in cancer immunotherapy*. Adv Exp Med Biol, 2008. **622**: p. 255-60.

390. Curiel, T.J., *Regulatory T cells and treatment of cancer*. *Curr Opin Immunol*, 2008. **20**(2): p. 241-6.
391. Mascitelli, L. and F. Pezzetta, *Regulatory T cells, allergic diseases, and cancer*. *Chest*, 2008. **133**(3): p. 832.
392. Wilczynski, J.R., J. Kalinka, and M. Radwan, *The role of T-regulatory cells in pregnancy and cancer*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 2275-89.
393. Xiong, X.Z., et al., [*Correlation between FoxP3(+) regulatory T cells and chronic obstructive pulmonary disease*]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2008. **88**(7): p. 471-4.
394. Perros, F., S. Cohen-Kaminsky, and M. Humbert, *Understanding the role of CD4+CD25(high) (so-called regulatory) T cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension*. *Respiration*, 2008. **75**(3): p. 253-6.
395. Ulrich, S., et al., *Increased regulatory and decreased CD8+ cytotoxic T cells in the blood of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension*. *Respiration*, 2008. **75**(3): p. 272-80.
396. Cobbold, S.P., *Regulatory T cells and transplantation tolerance*. *J Nephrol*, 2008. **21**(4): p. 485-96.
397. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. *Cell*, 2008. **133**(5): p. 775-87.
398. Aswad, F., H. Kawamura, and G. Dennert, *High sensitivity of CD4+CD25+ regulatory T cells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: a role for P2X7 receptors*. *J Immunol*, 2005. **175**(5): p. 3075-83.
399. Beyersdorf, N., et al., *Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Exp Med*, 2005. **202**(3): p. 445-55.
400. Ko, K., et al., *Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells*. *J Exp Med*, 2005. **202**(7): p. 885-91.
401. Tree_Star_Inc. *Flowjo, Flow Cytometry Analysis Software*. 2008 [cited 2008 August 4th]; Available from: <http://www.flowjo.com/v7/html/proliferation.html>.
402. Jiang, S., et al., *In vitro expanded alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cell treatment for the induction of donor-specific transplantation tolerance*. *Int Immunopharmacol*, 2006. **6**(13-14): p. 1879-82.
403. Klein, L., K. Khazaie, and H. von Boehmer, *In vivo dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(15): p. 8886-91.
404. Walker, L.S., et al., *Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo*. *J Exp Med*, 2003. **198**(2): p. 249-58.
405. Fisson, S., et al., *Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state*. *J Exp Med*, 2003. **198**(5): p. 737-46.
406. Trenado, A., et al., *Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(11): p. 1688-96.
407. Nishimura, E., et al., *Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells*. *Int Immunol*, 2004. **16**(8): p. 1189-201.

408. Xia, G., et al., *Tracking ex vivo-expanded CD4+CD25+ and CD8+CD25+ regulatory T cells after infusion to prevent donor lymphocyte infusion-induced lethal acute graft-versus-host disease*. Biol Blood Marrow Transplant, 2004. **10**(11): p. 748-60.
409. Fuchs, R., et al., *Frequency of natural regulatory CD4+CD25+ T lymphocytes determines the outcome of tolerance across fully mismatched MHC barrier through linked recognition of self and allogeneic stimuli*. J Immunol, 2006. **176**(4): p. 2324-9.
410. Nomura, M., et al., *The cellular basis of cardiac allograft rejection. IX. Ratio of naive CD4+CD25+ T cells/CD4+CD25- T cells determines rejection or tolerance*. Transpl Immunol, 2006. **15**(4): p. 311-8.
411. Xia, G., et al., *Targeting acute allograft rejection by immunotherapy with ex vivo-expanded natural CD4+ CD25+ regulatory T cells*. Transplantation, 2006. **82**(12): p. 1749-55.
412. Cobbold, S.P., et al., *Regulatory T cells in the induction and maintenance of peripheral transplantation tolerance*. Transpl Int, 2003. **16**(2): p. 66-75.
413. Sho, M., et al., *Requirements for induction and maintenance of peripheral tolerance in stringent allograft models*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(37): p. 13230-5.
414. Kurtz, J., T. Wekerle, and M. Sykes, *Tolerance in mixed chimerism - a role for regulatory cells?* Trends Immunol, 2004. **25**(10): p. 518-23.
415. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state*. Int Immunol, 1998. **10**(12): p. 1969-80.
416. Valencia, X., et al., *TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells*. Blood, 2006. **108**(1): p. 253-61.
417. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, *Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(14): p. 5126-31.
418. Joffre, O., et al., *Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4(+)/CD25(+)/Foxp3(+) regulatory T lymphocytes*. Nat Med, 2007.

Annexe 1 – CD4⁺CD25⁺ Regulatory T cell isolation kit



CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit mouse

Order no. 130-091-041

Index

1. Description
 - 1.1 Principle of MACS Separation
 - 1.2 Background and product applications
 - 1.3 Reagent and instrument requirements
2. Protocol
 - 2.1 Sample preparation
 - 2.2 Magnetic labeling of non-CD4⁺ T cells and fluorescent labeling of CD25⁺ cells
 - 2.3 Magnetic separation: Depletion of non-CD4⁺ T cells
 - 2.4 Magnetic labeling of CD25⁺ cells
 - 2.5 Magnetic separation: Positive selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells
3. Example of a separation using the CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit
4. References

1. Description

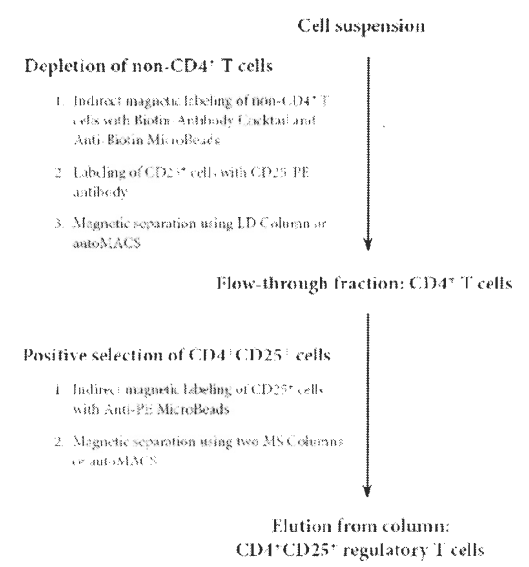
| | |
|-----------------------|---|
| Components | <p>1 mL CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Biotin-Antibody Cocktail, mouse: Cocktail of biotin-conjugated monoclonal anti-mouse antibodies against: CD8a (1 y-2; isotype: rat IgG2a), CD11b (Mac-1; isotype: rat IgG2b), CD45R (B220; isotype: rat IgG2a), CD49b (DX5; isotype: rat IgM) and Ter-119 (isotype: rat IgG2b).</p> <p>2 mL Anti-Biotin MicroBeads: MicroBeads conjugated to monoclonal anti biotin antibody (isotype: mouse IgG1)</p> <p>1 mL CD25-PE, mouse: Monoclonal anti-mouse CD25 antibody conjugated to R-Phycoerythrin (PE) (clone: 7D4; isotype: rat IgM)</p> <p>1 mL Anti-PE MicroBeads: MicroBeads conjugated to monoclonal anti-PE antibodies (isotype: mouse IgG1)</p> |
| Size | For 10 ⁹ leukocytes, up to 100 separations. |
| Product format | All components are supplied in buffer containing stabilizer and 0.05% sodium azide |
| Storage | Store protected from light at 2–8 °C. Do not freeze. The expiration date is indicated on the vial label. |

1.1 Principle of MACS[®] Separation

Mouse CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are isolated in a two-step procedure. First, CD4⁺ T cells are pre-enriched by depletion of unwanted cells. Then, CD25⁺ cells are positively selected from the enriched CD4⁺ T cell fraction.

For the isolation of CD4⁺ T cells, non-CD4⁺ T cells are indirectly magnetically labeled with a cocktail of biotin-conjugated antibodies and Anti-Biotin MicroBeads. In parallel, the cells are labeled with CD25-PE. The cell suspension is loaded onto a MACS[®] Column, which is placed in the magnetic field of a MACS Separator. The magnetically labeled non-CD4⁺ T cells are retained in the column, while the unlabeled, CD4⁺ T cells run through.

For the isolation of CD4⁺CD25⁺ cells, the CD25⁺ PE-labeled cells in the enriched CD4⁺ T cell fraction are magnetically labeled with Anti-PE MicroBeads. The cell suspension is again loaded onto a column which is placed in the magnetic field of a MACS Separator. The magnetically labeled CD4⁺CD25⁺ cells are retained in the column, while the unlabeled cells run through. After removal of the column from the magnetic field, the retained CD4⁺CD25⁺ cells are eluted as the positively selected cell fraction and once again separated over a new column, to achieve highest purities.



1.2 Background and product applications

The CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit was developed for the isolation of mouse CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from single-cell suspensions of spleen or lymph nodes.

CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells have been shown to actively suppress immune responses against autologous and foreign antigens.



in vivo and *in vitro*, CD25, the IL-2R α chain, is also expressed on activated CD8⁺ T cells, dendritic cells (DCs), and B cells.

The kit contains a cocktail of lineage specific biotin-conjugated antibodies against CD8 (Ly-2), CD11b (Mac-1), CD45R (B220), CD49b (DX5), Ter-119, and Anti-Biotin MicroBeads for depletion of non-CD4⁺ T cells, as well as CD25-PE and Anti-PE MicroBeads for subsequent positive selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells.

Example of applications

- Isolation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from single-cell suspensions of spleen or lymph nodes for:
 - co-culture experiments with DCs to study priming of DCs for tolerance induction *in vitro* and after adoptive transfer of primed DCs *in vivo*.¹
 - adoptive transfer experiments (e.g. from UV-exposed mice) to analyze the role of regulatory T cells during induction and elicitation of hapten-specific tolerance.²

1.3 Reagent and instrument requirements

- Buffer: Phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, supplemented with 0.5% bovine serum albumin (BSA) and 2 mM EDTA. Keep buffer cold (4–8 °C). Degas buffer before use, as air bubbles could block the column.
 - ▲ Note: EDTA can be replaced by other supplements such as anticoagulant citrate dextrose formula A (ACD-A) or citrate phosphate dextrose (CPD). BSA can be replaced by other proteins such as gelatin, murine serum, or fetal calf serum. Buffers or media containing Ca²⁺ or Mg²⁺ are not recommended for use.
- (Optional) Pre-Separation Filters (# 130-041-407) to remove cell clumps.
- (Optional) Propidium iodide (PI) or 7-AAD for the exclusion of dead cells.
- (Optional) Fluorochrome-conjugated CD4 antibody: e.g. CD4-FITC (# 130-091-608), CD4-PE (# 130-091-607), or CD4-APC (# 130-091-611).
- MACS Columns and MACS Separators: Depletion of non-CD4 T cells is performed on an LD Column. The subsequent positive selection of CD4⁺CD25⁺ T cells is performed on two MS Columns. Depletion and positive selection can also be performed by using the autoMACS⁺ Separator.

| Column | Max. number of labeled leukocytes | Max. number of total leukocytes | Separator |
|---|-----------------------------------|---------------------------------|---|
| Depletion | | | |
| LD | 10 ⁸ | 5 × 10 ⁸ | MidMACS, QuadroMACS, VarioMACS, SuperMACS |
| Positive selection | | | |
| MS | 10 ⁷ | 2 × 10 ⁸ | MiniMACS, OctoMACS, VarioMACS, SuperMACS |
| Depletion and positive selection | | | |
| autoMACS | 2 × 10 ⁸ | 4 × 10 ⁹ | autoMACS |

▲ Note: Column adapters are required to insert certain columns into the VarioMACS or SuperMACS⁺ Separators. For details see the respective MACS Separator data sheet.

2. Protocol

2.1 Sample preparation

Prepare a single cell suspension from spleen or lymph nodes using standard methods.

▲ Note: The Kit is not optimized for the isolation of regulatory T cells from blood and thymus.

▲ Red blood cell lysis or density gradient centrifugation is not necessary, since the CD4⁺CD25⁺ T Cell Biotin-Antibody Cocktail contains Anti-Ter-119 antibody.




2.2 Magnetic labeling of non-CD4⁺ cells and fluorescent labeling of CD25⁺ cells

▲ Work fast, keep cells cold and use pre-cooled solutions. This will prevent capping of antibodies on the cell surface and non-specific cell labeling.

▲ Volumes for magnetic labeling given below are for a starting cell number of 10⁷ leukocytes. When working with fewer than 10⁷ cells, use the same volumes as indicated. When working with higher cell numbers, scale up all reagent volumes and total volumes accordingly (e.g. for 2 × 10⁷ leukocytes use twice the volume of all indicated reagent volumes and total volumes).

▲ For an optimal performance it is important to obtain a single-cell suspension before magnetic separation. Pass cells through 30 μm nylon mesh (Pre-Separation Filters, # 130-041-407) to remove cell clumps which may clog the column.

1. Determine number of leukocytes.
2. Centrifuge cells at 300 × g for 10 minutes. Aspirate supernatant completely.
3. Resuspend cell pellet in 40 μL of buffer per 10⁷ total cells.
4. Add 10 μL of Biotin-Antibody Cocktail per 10⁷ total cells.
5. Mix well and refrigerate for 10 minutes (4–8 °C).
 - ▲ Note: Working on ice may require increased incubation times. Higher temperatures and/or longer incubation times may lead to non-specific cell labeling.
6. Add 30 μL of buffer, 20 μL of Anti Biotin MicroBeads and 10 μL of CD25-PE antibody per 10⁷ total cells.
7. Mix well and refrigerate for an additional 15 minutes in the dark (4–8 °C).
8. Wash cells by adding 1–2 mL of buffer per 10⁷ total cells and centrifuge at 300 × g for 10 minutes. Aspirate supernatant completely.
9. Resuspend cell pellet in buffer:
 - Depletion with LD Column: 500 μL per up to 1.25 × 10⁸ cells.
 - Depletion with autoMACS: 500 μL per up to 10⁸ cells.
 - ▲ Note: For larger cell numbers, scale up buffer volume accordingly.
10. Proceed to magnetic separation (2.3).



2.3 Magnetic separation: Depletion of non-CD4⁺ T cells

Depletion with LD Column

1. Place LD Column in the magnetic field of a suitable MACS Separator. For details see LD Column data sheet.
2. Prepare column by rinsing with 2 mL of buffer.
3. Apply cell suspension onto the column.
4. Collect unlabeled cells which pass through and wash column with 2×1 mL of buffer. Perform washing steps by adding buffer successively once the column reservoir is empty. Collect total effluent. This is the unlabeled CD4⁺ T cell fraction.
5. Proceed to 2.4 for the enrichment of CD4⁺CD25⁺ T cells.

Depletion with the autoMACS™ Separator

▲ Refer to the autoMACS™ User Manual for instructions on how to use the autoMACS Separator.


1. Prepare and prime the autoMACS Separator.
2. Place the tube containing the magnetically labeled cells in the autoMACS Separator. Choose separation program "Depl025".
3. Collect the unlabeled fraction from outlet port neg1. This is the enriched CD4⁺ T cell fraction.
4. Proceed to 2.4 for the enrichment of CD4⁺CD25⁺ T cells.



2.4 Magnetic labeling of CD25⁺ cells

▲ Volumes for magnetic labeling given below are for an initial starting cell number of up to 10⁷ leukocytes. For larger initial cell numbers, scale up volumes accordingly.

1. Centrifuge isolated CD4⁺ T cells at 300×g for 10 minutes. Aspirate supernatant completely.
2. Resuspend cell pellet in 90 µL of buffer.
3. Add 10 µL of Anti-PE MicroBeads.
4. Mix well and refrigerate for 15 minutes in the dark (4–8 °C).
▲ Note: Working on ice may require increased incubation times. Higher temperatures and/or longer incubation times may lead to non-specific cell labeling.
5. Wash cells by adding 1–2 mL of buffer and centrifuge at 300×g for 10 minutes. Aspirate supernatant completely.
6. Resuspend up to 10⁸ cells in 500 µL of buffer.
▲ Note: For larger cell numbers, scale up buffer volume accordingly.
7. Proceed to magnetic separation (2.5).



2.5 Magnetic separation: Positive selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells

Positive selection with MS Columns

▲ To achieve highest purities, always perform two consecutive column runs.

1. Place MS Column in the magnetic field of a suitable MACS Separator. For details see MS Column data sheet.
2. Prepare column by rinsing with 500 µL of buffer.
3. Apply cell suspension onto the column.
4. Let cells pass through and wash column with 3×500 µL of buffer. Perform washing steps by adding buffer three times, once the column reservoir is empty.
5. Remove column from the separator and place it on a suitable collection tube.
6. Pipette 1 mL of buffer onto the column. Immediately flush out the magnetically labeled cells (CD4⁺CD25⁺ cells) by firmly pushing the plunger into the column.

▲ Note: To perform a second column run, you may elute the cells directly from the first onto the second, equilibrated column instead of a collection tube.

7. Repeat the magnetic separation procedure as described in steps 1–6 by using a new MS Column.

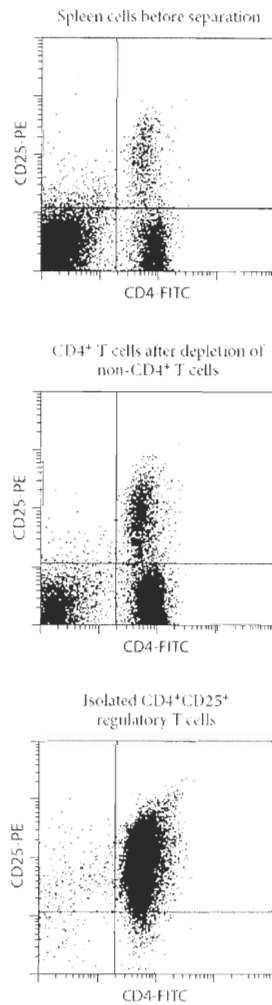
Positive selection with the autoMACS Separator

▲ Refer to the autoMACS User Manual for instructions on how to use the autoMACS Separator.

1. Prepare and prime the autoMACS Separator.
2. Place the tube containing the magnetically labeled cells in the autoMACS Separator. Choose separation program "Posseld2".
3. Collect the positive fraction from outlet port pos2. This is the enriched CD4⁺CD25⁺ T cell fraction.

3. Example of a separation using the CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit

CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells were isolated from mouse spleen cell suspension using the CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit, an LD and two MS Columns, a MidiMACS™ Separator and a MiniMACS™ Separator. Cells were additionally stained with CD4 FITC. Cell debris and dead cells were excluded from analysis based on scatter signals and PI fluorescence.



4. References

1. Fallarino, F. *et al.* (2003) Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4(12): 1206–1212. [3982]
2. Schwarz, A. *et al.* (2004) Ultraviolet Radiation-Induced Regulatory T Cells Not Only Inhibit the Induction but Can Suppress the Effector Phase of Contact Hypersensitivity. *J. Immunol.* 172: 1036–1043. [3791]

Warnings

Reagents contain sodium azide. Under acidic conditions sodium azide yields *hydrazoic acid*, which is extremely toxic. Azide compounds should be diluted with *running water* before discarding. These precautions are recommended to avoid deposits in plumbing where explosive conditions may develop.

Warranty

The products sold hereunder are warranted only to be free from defects in workmanship and material at the time of delivery to the customer. Miltenyi Biotec GmbH makes no warranty or representation, either expressed or implied, with respect to the fitness of a product for a particular purpose. There are no warranties, expressed or implied, which extend beyond the technical specifications of the products. Miltenyi Biotec GmbH's liability is limited to either replacement of the products or refund of the purchase price. Miltenyi Biotec GmbH is not liable for any property damage, personal injury or economic loss caused by the product.

MACS is a registered trademark of Miltenyi Biotec GmbH.

autoMACS, MidiMACS, MiniMACS, OctoMACS, QuadroMACS, SuperMACS, and VarioMACS are trademarks of Miltenyi Biotec GmbH.

© 2006 Miltenyi Biotec GmbH. Printed in Germany.