

SALOUA TAGMOUTI

**LA TRANSPLANTATION DE MYOBLASTES
PROTÈGE LE MUSCLE MDX DU DOMMAGE
INDUIT PAR LES CONTRACTIONS
EXCENTRIQUES**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en médecine expérimentale
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2007

Résumé

La dystrophie musculaire de Duchenne est une dystrophie héréditaire secondaire à l'absence de la dystrophine, ce qui induit une faiblesse et une dégénérescence des muscles. Bien que plusieurs études ont démontré que la greffe de myoblastes permet de rétablir l'expression de la dystrophine, aucune étude physiologique n'a été réalisée, jusqu'à présent, pour démontrer qu'elle peut améliorer les propriétés contractiles du muscle.

Dans ce travail, j'ai étudié l'effet de la greffe de myoblastes normaux sur les propriétés contractiles du muscle de la souris mdx, un modèle animal de la maladie de Duchenne. Mes travaux ont permis de démontrer que cette greffe protège le muscle mdx durant les contractions excentriques et que cet effet n'est pas expliqué seulement par l'expression de la dystrophine. En effet, l'étude des propriétés contractiles des muscles mdx transplantés avec des myoblastes mdx, montre que les muscles greffés sont aussi moins vulnérables aux contractions excentriques que les muscles mdx non greffés.

Abstract

Duchenne muscular dystrophy is a hereditary dystrophy that results from a mutation of the dystrophin gene, which induces the weakness of muscles. Although several studies have already shown that the transplantation of normal myoblasts permit to restore the expression of dystrophin, no physiological study was made to verify whether myoblast transplantation is able to improve the muscle contractile properties.

In this study, I have studied the effects of normal myoblast transplantation on the contractile properties of muscles of mdx mice, a model of Duchenne Muscular Dystrophy. My studies have shown that the transplantation of normal myoblasts protects mdx muscle from damage induced by eccentric contractions, and that this effect can not be explained only by the expression of dystrophin. Indeed, the comparison of mdx muscles transplanted with mdx myoblasts with non-transplanted muscles indicated that the transplanted muscles are more resistant to eccentric contractions than the non-transplanted ones.

Avant-Propos

Avant tout, je voudrais remercier le Dr Jacques P. Tremblay pour la confiance qu'il a placée en moi le premier jour où j'ai atterri dans son laboratoire. Quand je dis « atterrir », je veux dire que je n'avais aucune idée sur la recherche, compte tenu de ma formation de médecin. La première chose que j'ai due apprendre d'ailleurs, c'est bien de manipuler une pipette. Je veux dire aussi que je suis venue directement du Maroc, mon pays d'origine, et que j'ai appris à connaître la culture québécoise à travers les gens avec qui j'ai travaillé dans le laboratoire.

J'ai appris beaucoup de choses depuis que je suis ici. J'ai même appris à regarder la médecine d'une nouvelle manière. En tant que médecins, on oublie souvent que chaque mot qu'on apprend dans nos cours, chaque traitement qu'on prescrit à un malade, est le fruit de longues années de travail d'une ou de plusieurs équipes de recherche comme celle avec qui j'ai eu la chance de travailler. Travailler dans la recherche demande beaucoup de patience et surtout beaucoup de passion, c'est bien les deux qualités primordiales que doit avoir un chercheur, et c'est pour cette raison que, à mes yeux, c'est une discipline aussi noble que celle de la médecine.

*Je dédie ce travail à mon époux, mon père,
ma mère, mes sœurs et mon frère. Non sans
oublier, mes deux adorables petites nièces
Lina et Sarah pour qui je voue une affection
toute particulière. Enfin, je ne saurais oublier
mes amis aussi bien au Maroc qu'au Québec*

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Avant-Propos.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Introduction.....	1
Chapitre 1: Dystrophie musculaire de Duchenne.....	3
1.1 Structure et physiologie du muscle squelettique.....	3
1.1.1 Structure du muscle squelettique.....	3
1.1.2 Régénération musculaire.....	6
1.1.3 Cellule satellite.....	7
1.1.4 Physiologie de la contraction musculaire.....	8
1.2 Aspects fondamentaux de la maladie.....	9
1.2.1 Historique.....	9
1.2.2 Aspects cliniques et évolution de la maladie de Duchenne.....	10
1.2.3 Définition et fonction de la dystrophine.....	13
1.2.4 Génétique de la maladie de Duchenne.....	15
1.2.5 Modèles animaux de la maladie.....	16
1.2.6 Thérapies envisagées.....	17
1.3 Études des propriétés contractiles musculaires de la souris mdx.....	35
1.4 Hypothèse générale.....	36
Chapitre 2: Dystrophin expression following the transplantation of normal muscle precursor cells protects mdx muscle from contraction-induced damage.....	39
2.1 Abstract.....	40
2.2 Introduction.....	41
2.3 Material and methods.....	42
2.3.1 Materials.....	42
2.3.2 Mouse MPC culture.....	43
2.3.3 MPC transplantation.....	43
2.3.4 Immunosuppression.....	43
2.3.5 Muscle contractile properties.....	44
2.3.6 Histological Studies.....	45
2.4 Results.....	46
2.4.1 Presence of dystrophin positive fibers.....	46
2.4.2 Transplantation of mdx MPCs has an effect on mdx EDL total and specific forces.....	46
2.4.3 Transplantation of mdx MPCs increases muscle resistance to eccentric contractions.....	46
2.4.4 Dystrophin expression does not increase significantly EDL total and specific force of mdx mice.....	47
2.4.5 Dystrophin expression results in better protection of EDL against eccentric contraction in mdx mice.....	48
2.5 Discussion.....	48

2.6 Figures Legends.....	52
2.7 Figures	54
2.8 Tables.....	59
Conclusion.....	60
Bibliographie	62

Liste des tableaux

Tableau 1: Characteristics of mice and transplanted EDL muscles.....	5
--	---

Liste des figures

Chapitre 1 :

Figure 1: Organisation du muscle squelettique au niveau macroscopique et microscopique.....	5
Figure 2: Description clinique de la maladie de Duchenne.....	12
Figure 3: Représentation schématique du complexe de la dystrophine.....	14
Figure 4: Représentation du principe de la transplantation de myoblastes.....	24
Figure 5: Illustration de la technique de greffe de myoblastes chez l'humain.....	27
Figure 6: Représentation schématique des trois principaux problèmes de la transplantation de myoblastes.....	29

Chapitre 2:

Figure 7: Transplantation of mdx MPCs has an effect on mdx EDL total and specific force.....	54
Figure 8: MPC transplantation can increase muscle resistance to eccentric contractions.....	55
Figure 9: Dystrophin expression does not increase significantly mdx EDL total and specific force.....	56
Figure 10: Dystrophin expression results in better protection of EDL against eccentric contraction in mdx mice.....	57
Figure 11: Effect of myoblastes transplantation on muscle structure.....	58

Introduction

La maladie de Duchenne est sans doute l'une des maladies héréditaires les plus graves et c'est l'une des dystrophies musculaires les plus fréquentes. Elle est due à l'absence de la dystrophine, molécule de structure retrouvée normalement sous la surface de la fibre musculaire. La gravité de la maladie réside dans le fait que tous les muscles de l'organisme faiblissent progressivement et empêchent éventuellement tout mouvement, y compris la respiration.

Actuellement, il n'existe aucun traitement curatif ; le seul espoir pour pouvoir un jour guérir les malades réside dans la recherche de nouveaux traitements. Les progrès effectués dans la connaissance des mécanismes de la maladie ont permis de formuler des hypothèses thérapeutiques, ce qui a donné naissance à de nombreux programmes de recherche. Parmi les projets de recherche, la thérapie cellulaire est l'un des plus prometteurs. Elle consiste en une greffe de myoblastes sains dans le muscle du malade ce qui corrige l'expression de la dystrophine. Malgré l'énorme progrès de la recherche pour améliorer cette technique, il reste encore un long chemin à parcourir avant de pouvoir appliquer ce traitement chez l'humain. Cette thérapie doit faire face à divers obstacles, parmi lesquels la faible migration des cellules transplantées et leur mort suite au phénomène de rejet immunitaire.

Certains inconvénients de la technique, et notamment l'incapacité de greffer les muscles cardiaque et respiratoires, font douter quelques-uns de son applicabilité chez l'homme. Cependant, comparée aux autres traitements proposés, la transplantation de myoblastes reste sans doute le traitement le plus réaliste et le moins dangereux pour l'instant.

Le but de ce travail est de vérifier si la transplantation de myoblastes normaux dans un muscle dystrophique augmente la résistance de ce muscle durant la contraction. En effet, même s'il a été prouvé chez les différentes espèces expérimentales et même chez l'homme que le rétablissement de l'expression de la dystrophine est possible avec cette technique, l'effet auquel va s'attendre le patient et qui va témoigner de l'efficacité du traitement, est le rétablissement de la force musculaire et le ralentissement de la progression de la maladie.

C'est pour cette raison qu'à ce stade de la recherche sur la transplantation de myoblastes est devenu nécessaire de prouver l'effet de la technique sur la fonction des muscles traités.

Chapitre 1: Dystrophie musculaire de Duchenne

1.1 Structure et physiologie du muscle squelettique

1.1.1 Structure du muscle squelettique

Le muscle squelettique est constitué de plusieurs fibres musculaires, ce sont des cellules cylindriques multinucléées d'un diamètre de 10 à 100 μm . La fibre musculaire représente l'unité contractile du muscle.

Le tissu conjonctif qui entoure les fibres musculaires est important pour leur fonctionnement. Il confère ainsi de l'élasticité au muscle, permet d'accumuler de l'eau et sert également de réservoir de facteurs de croissance impliqués dans la régénération et la croissance musculaire.

La fibre musculaire est entourée de la membrane basale qui est constituée de deux feuillets, la lamina densa et la lamina rara. Cette membrane basale agit comme une armature pour la régénération des fibres musculaires après un stress. En effet, suite à la lésion d'une fibre musculaire, les couches adjacentes de la membrane basale ne sont pas détruites et les cellules satellites vont venir réparer la fibre musculaire sous la membrane basale.

La lame basale est en continuité avec l'endomysium, qui entoure individuellement les fibres musculaires. Le périnysium quant à lui, sépare les paquets de fibres musculaires (fascicules). Le périnysium est le prolongement de l'épinysium, qui entoure le muscle en entier (figure 1).

Il existe plusieurs types de fibres musculaires squelettiques qui possèdent des capacités contractiles et des caractéristiques différentes :

- Fibres musculaires de Type I: ces fibres sont surtout retrouvées dans les muscles de postures. Elles se contractent lentement et sont résistantes à la fatigue, et elles contiennent beaucoup de myoglobine et de mitochondries.

- Fibres musculaires de Type II-A : ces fibres sont à contraction lente et sont résistantes à la fatigue. Elles contiennent également beaucoup de myoglobine et de mitochondries.

- Fibres de Type II-B : elles se contractent rapidement et ne sont pas résistantes à la fatigue. Ceci est expliqué par la faible teneur des fibres en mitochondries et en myoglobine (Sciote and Morris 2000)

Le motoneurone est responsable de l'innervation du muscle. La plaque motrice est la zone où un axone du nerf réalise une synapse avec une fibre musculaire. Le nerf contrôle l'état d'excitation du muscle; l'influx nerveux induit ainsi la libération de l'acétylcholine par la terminaison nerveuse ce qui produit la contraction musculaire.

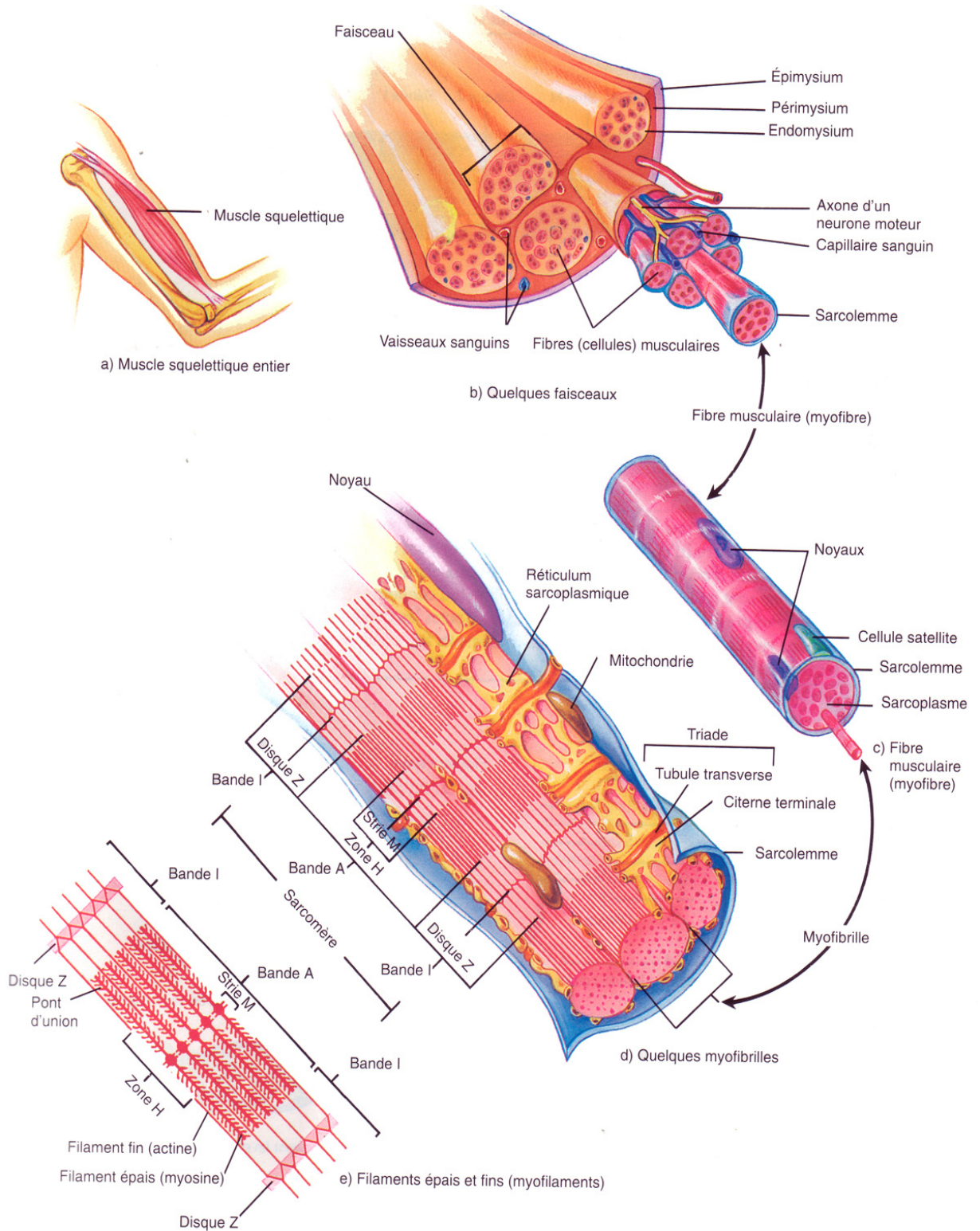


Figure 1 : Organisation du muscle squelettique au niveau macroscopique et microscopique.

(Tortora et al. 1994)

1.1.2 Régénération musculaire

La fibre musculaire squelettique est une cellule qui se régénère continuellement. En effet, suite aux différents facteurs de stress ischémique, pharmacologique, thermique ou mécanique, le muscle squelettique va subir des dommages et les cellules musculaires vont entrer dans différents cycles de dégénération et de régénération. Le muscle squelettique se régénère de façon autonome et identique quelque soit le type de traumatisme en cause (Allbrook 1981). La régénération musculaire est un processus très efficace qui se fait tout le temps en deux phases (Grounds 1991):

- Phase initiale non inflammatoire : Elle survient immédiatement après la rupture de la membrane de la fibre musculaire, et se caractérise par des entrées de calcium en intracellulaire et par la destruction de certains organites intracellulaires comme les mitochondries, les ribosomes et les myofibrilles. Les entrées de calcium peuvent être détectées par des colorations comme la « Alizarin red », qui colore le calcium en intracellulaire. Suite également à la perméabilité de la fibre musculaire, il y a une libération de certaines protéines musculaires dans le sang, comme la créatine kinase ou la troponine, qui peuvent être mesurées dans le sérum.
- Phase de dégénérescence inflammatoire : elle se caractérise par l’envahissement du muscle par des cellules inflammatoires comme les neutrophiles qui sont les premiers à arriver suivis des macrophages. Le rôle de ces cellules est de phagocyter les débris cellulaires et de produire des facteurs chémoattractants nécessaires pour attirer les cellules satellites qui vont réparer la fibre musculaire (Bischoff and Heintz 1994). En effet, les macrophages et les neutrophiles sont capables de sécréter certains facteurs de croissance qui stimulent les cellules satellites comme le "leukemia inhibitory factor" (LIF) et l'interleukine 6 (IL-6) (Kami and Senba 1998), on retrouve également le TGF- β et le TNF- α (Murakami et al. 1999) (Porreca et al. 1999).

La position du noyau dans la fibre musculaire indique si celle-ci a été rénovée récemment. En effet, la centronucléation indique qu'une fibre musculaire est en pleine régénération et le retour du noyau vers la périphérie constitue la dernière étape de cette phase chez l'humain. Chez les patients atteints de la maladie de Duchenne, on peut voir beaucoup de fibres musculaires avec des noyaux centraux, ce qui témoigne du processus intense de régénération secondaire à l'augmentation de la fragilité musculaire.

1.1.3 Cellule satellite

Les cellules satellites ont été décrites pour la première fois chez la grenouille (Mauro 1961). Il s'agit de cellules mononuclées qui se trouvent sous la membrane basale à un état quiescent, leur rôle est d'assurer la régénération des fibres musculaires. Une fois qu'un dommage musculaire survient, les cellules satellites entrent dans le cycle cellulaire et commencent à se multiplier.

On arrive à reconnaître les cellules satellites grâce à leur état de quiescence, elles ont peu d'organelles cellulaires et un noyau hétérochromatique; elles expriment également différents marqueurs comme le c-met, le récepteur du HGF/SF (Tatsumi et al. 1998) et le Pax7 (Seale et al. 2000). Les cellules satellites n'expriment pas la dystrophine, ce n'est qu'après la fusion qu'elles commencent à l'exprimer (Barnea et al. 1990).

La densité des cellules satellites dans un muscle dépend de plusieurs facteurs. Les fibres musculaires à contraction rapide contiennent moins de cellules satellites que ceux à contraction lente. Leur nombre et leur capacité proliférative diminuent également avec l'âge (Conboy and Rando 2005; Lorenzon et al. 2004); ceci implique que les cellules satellites provenant d'un fœtus ont une capacité de prolifération deux à trois fois plus importante que celles de l'adulte. Cependant, une étude récente faite chez la souris montre que les myoblastes dérivés des nouveau nés prolifèrent et survivent moins bien que celles provenant des adultes (Lee-Pullen et al. 2004). Dans les modèles expérimentaux chez la souris, la greffe de myoblastes se fait souvent avec des cellules satellites provenant de bébés souris de 2 à 3 jours.

La capacité de régénération des cellules satellites est plus importante chez la souris mdx comparativement à la souris normale ; ceci est expliqué par le fait que les muscles mdx subissent d'importants cycles de dégénération et régénération et que les cellules satellites sont constamment en prolifération pour assurer la réparation du muscle (Yang et al. 1992).

1.1.4 Physiologie de la contraction musculaire

La fibre musculaire constitue l'unité fonctionnelle du muscle. Dans une fibre musculaire au repos, le Na^+ constitue le principal ion extracellulaire, tandis que le K^+ est essentiellement intracellulaire. L'excitation du motoneurone induit une libération d'acétylcholine dans la fente synaptique de la plaque motrice ce qui active les canaux à sodium et à potassium. L'entrée brutale du Na^+ dans la cellule associée à la sortie brutale de K^+ crée un potentiel électrique appelé onde de dépolarisation. Cette onde se propage le long de la membrane plasmatique, cette dernière s'invagine à l'intérieur de la fibre musculaire pour former des canaux intracellulaires ou tubules en T. Ainsi, la dépolarisation peut atteindre l'ensemble des myofibrilles (Lamb 2002).

Les réservoirs sarcoplasmiques qui sont en connexion avec les tubules en T relâchent le calcium une fois que l'onde de dépolarisation les atteint. Le calcium se fixe sur la troponine C, le changement ensuite de la conformation de la tropomyosine expose les sites actifs de l'actine en face de ceux de la myosine. La tête de la myosine est une ATPase, en présence d'ATP, la myosine se fixe sur l'actine, libère $\text{ADP} + \text{P}$; la modification de l'angle de la tête de la myosine de 45° déplace le filament d'actine de 10 nm ce qui produit un raccourcissement de la longueur de la fibre. En présence d'une seconde molécule d'ATP, la formation d'un complexe Actine-Myosine-ATP qui a une faible affinité pour l'actine ; entraîne une dissociation de la liaison Actine-Myosine avec libération d' $\text{ADP} + \text{P}$. La succession de plusieurs cycles d'excitation et la mise en jeu de plusieurs liaisons Actine-Myosine, va entraîner une contraction musculaire (Sciote and Morris 2000).

1.2 Aspects fondamentaux de la maladie

1.2.1 Historique

Edward Meryon a décrit en 1851 deux frères d'une famille atteinte par la maladie, il a noté que les malades présentaient une faiblesse musculaire progressive qui prédominait au niveau des membres. Il a reconnu que la maladie est familiale et touche principalement les garçons. Ensuite, il a montré sur des autopsies que la moelle épinière était normale et en a déduit que la maladie était d'origine musculaire. Sur des biopsies de muscles atteints, il a pu constater des changements de la structure des muscles, dont la destruction de sarcolemme. Cette constatation constitue actuellement l'un des signes histologiques fondamentaux pour le diagnostic de la maladie sur des biopsies musculaires.

En 1868, Duchenne de Boulogne a décrit la maladie comme « une paralysie pseudo-hypertrophique » pensant qu'elle est provoquée par un trouble nerveux. Il a non seulement décrit les caractères histologiques de la maladie à partir de biopsies de muscles de 9 malades, mais également l'évolution de la maladie en publiant la première description de la maladie. Le premier cas qu'il a décrit illustre bien la présentation de la maladie : « Paralysie pseudo-hypertrophique; début dans la première enfance, par la faiblesse des membres inférieurs; grossissement considérable, à l'âge de 7 ans, des muscles moteurs des membres inférieurs et des extenseurs de la colonne vertebro-lombaire; généralisation progressive de la paralysie et abolition complète de tous les mouvements, à 13 ans et demi; intelligence obtuse ; mort phtisique, à 15 ans »(Duchenne 1968; Pearce 2005).

W.R. Gowers a décrit le caractère héréditaire de la maladie en 1886. Il a remarqué que des mères non malades pouvaient avoir des garçons malades, même en changeant de partenaire, en précisant également que la maladie est plutôt secondaire à un problème musculaire. Il a décrit une manœuvre par laquelle les patients peuvent se relever en utilisant les membres supérieurs parce que les muscles des membres inférieurs sont trop faibles pour supporter le poids du corps (Pearce 2005).

Ce n'est que bien plus tard que le mode de transmission de la maladie a été décrit par Stephens et Tyler en 1951, puis par Walton et Natrass en 1954, comme étant une maladie récessive liée au chromosome X en observant l'évolution de la maladie chez des familles atteintes.

Enfin, en 1987, Kunkel LM a pu identifier le gène de la dystrophine sur le chromosome X (Kunkel, Beggs, and Hoffman 1989; Kunkel et al. 1987).

1.2.2 Aspects cliniques et évolution de la maladie de Duchenne

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la dystrophie héréditaire la plus sévère, elle a une transmission récessive liée au chromosome X ; ce qui veut dire qu'elle touche majoritairement les garçons et que les mères de ces enfants atteints sont porteuses du gène de la maladie. L'incidence de la maladie est d'environ 1 cas sur 3500 nouveaux nés mâles. La maladie a une évolution lente et se caractérise par une faiblesse progressive des muscles squelettiques et cardiaque. Les signes de la maladie commencent à apparaître vers l'âge de 2 à 3 ans par des difficultés à se relever et à monter les marches. La pseudo-hypertrophie est remarquée chez les malades, elle est due à l'inflammation et à l'infiltration des muscles. Vers l'adolescence, la majorité des malades sont obligés d'utiliser la chaise roulante pour se déplacer vu la grande perte de force au niveau des muscles du corps (figure 2) (Tyler 2003).

La destruction musculaire progressive va conduire par la suite à un affaiblissement des muscles respiratoires qui va se compliquer d'une insuffisance respiratoire et d'infections respiratoires à répétition. Le muscle cardiaque est également atteint dès l'âge de 7 ans. L'insuffisance cardiaque, avec les complications respiratoires constituent les causes principales de décès qui arrive généralement dans la vingtaine.

Les symptômes de la maladie de Duchenne sont dus à une augmentation de la fragilité des fibres musculaires et à leur faible capacité de régénération. En effet, chez les malades

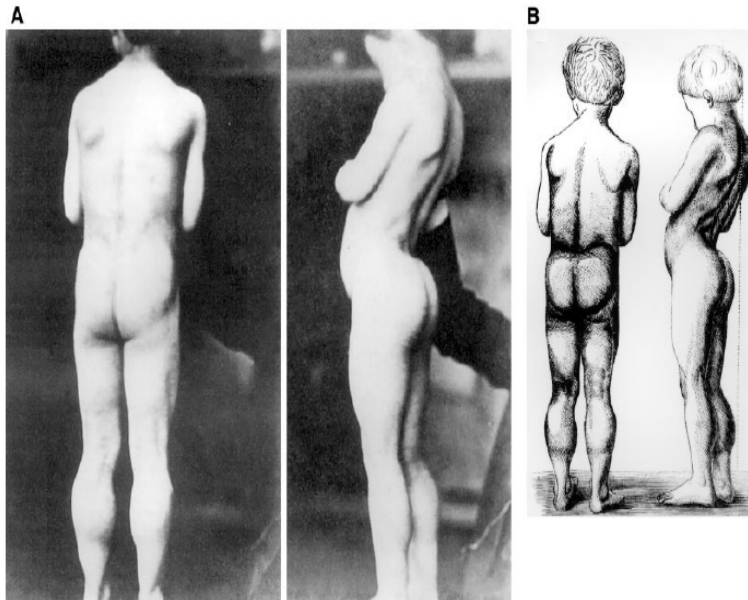
atteints de la DMD, les myoblastes sont anormaux, ils sont moins nombreux, et on a une capacité limitée de fusion (Biggar et al. 2002).

La destruction progressive et diffuse des fibres musculaires entraîne le largage de marqueurs musculaires comme la créatine phosphokinase humorale et la troponine dans le sang périphérique. A l'enfance et devant la présence des signes cliniques de la maladie et de l'augmentation du taux des enzymes musculaires, la biopsie musculaire permet de poser le diagnostic. Histologiquement, la maladie se traduit par une diminution progressive du nombre de fibres musculaires qui sont remplacées par du tissu conjonctifs et gras. Dans des cas avancés de la maladie, les muscles des malades contiennent très peu de fibres musculaires. Le diagnostic de la maladie peut également se faire en prénatal par amniocentèse. La majorité des malades ont une délétion du gène de la dystrophine qui peut être diagnostiquée par PCR. Les mutations ponctuelles, quant à elles, sont diagnostiquées par le séquençage complet du gène.

D'autres signes moins communs peuvent se voir, comme l'atteinte des muscles lisses qui se traduit par un dysfonctionnement des appareils digestif et urinaire (Barohn et al. 1988; Tubbs and Oakes 2004). Les malades atteints de la DMD peuvent également présenter des retards mentaux ; en effet, 30 % des patients ont un retard mental comparés à 9% dans la population de référence. L'absence de la dystrophine dans le cerveau est incriminée (Mehler 2000).

La DMD a été rarement décrite chez les femmes. Des patientes atteintes du syndrome de Turner, où les patientes possèdent un seul chromosome X, peuvent présenter la maladie. Cependant, des biopsies musculaires chez les femmes porteuses de la maladie à un stade précoce de la vie montrent que 50 % des fibres sont dystrophine négatives. Ceci est expliqué par le fait que pendant la vie embryonnaire, le choix du chromosome X qui va être actif se fait au hasard dans la cellule. Au fur et à mesure que la fille avance dans l'âge, les fibres dystrophiques vont dégénérer et vont être remplacées par des fibres dystrophine positives. Des biopsies musculaires des femmes porteuses à un stade tardif de la vie peuvent montrer 80-90% de fibres positives pour la dystrophine.

1.



2.

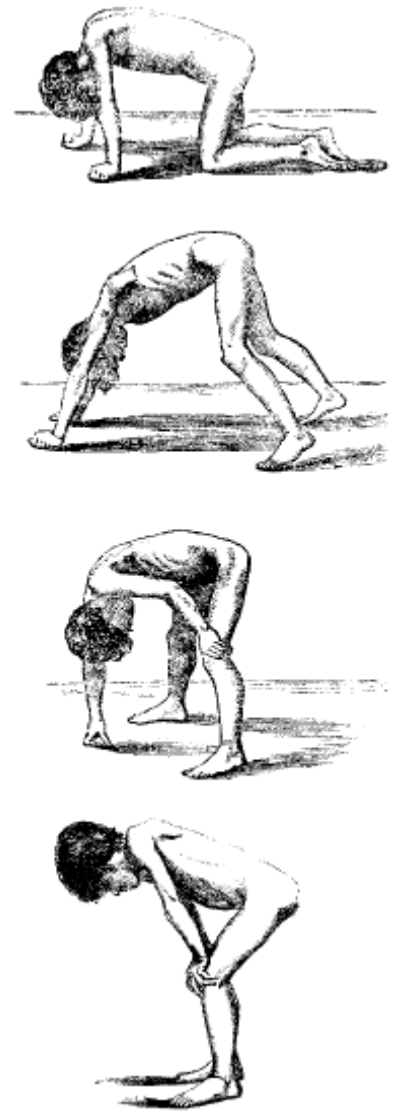


Figure 2: Description clinique de la maladie de Duchenne. (1) Photographie d'un patient atteint de la DMD prise par Duchenne, et une représentation schématique à partir de cette photo. (2) Représentation du signe de Gowers (Tyler 2003).

1.2.3 Définition et fonction de la dystrophine

La dystrophine est une énorme protéine composée de 3,685 acides aminés. Elle a un poids moléculaire de 427 kDa et une longueur de 125 nm. La dystrophine est plus abondante dans les muscles squelettiques et cardiaque, et elle est retrouvée en quantité bien moindre dans le cerveau.

La dystrophine est située sur la partie interne de la membrane de la cellule musculaire. Elle est un composant du complexe glycoprotéique de la dystrophine (DGC). Ce complexe de macromolécules a comme rôle de relier la laminine de la matrice extra-cellulaire aux actines du cytosquelette à travers la membrane de la fibre musculaire. Le DGC est constitué de dystrophine, de dystroglycans (α et β), de sarcoglycans (α , β , γ et δ), de sarcospan, de syntrophines ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$; $\gamma 1$ - and $\gamma 2$ -syntrophines qui ont été identifiées dans les neurones) et les α -dystrobrevines. Chaque mutation dans l'une des protéines du complexe peut conduire à une dystrophie. La dystrophie de Duchenne est probablement la plus sévère parce qu'elle s'accompagne d'une absence de tout le complexe (figure 3) (Lapidos, Kakkar, and McNally 2004).

La dystrophine est une protéine avant tout de structure, elle joue un rôle très critique dans le maintien de la stabilité de la fibre musculaire, en assurant la continuité entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire. Par son extrémité aminoterminal (N), la dystrophine se fixe aux filaments d'actine γ du cytosquelette sous-membranaire, tandis que du côté carboxyterminal (C), elle s'attache au complexe de glycoprotéines transmembranaires. Cette liaison permet d'ancrer l'appareil contractile à la surface externe de la membrane cellulaire, ce qui est important pour assurer l'intégrité du cytosquelette de la fibre musculaire. L'extrémité carboxyterminale de la dystrophine interagit avec d'autres protéines (syntrophines, dystrobrevine) qui fixent une isoforme de la « nitric oxyde synthase », diverses tyrosine-kinases et des canaux ioniques (Petrof 2002).

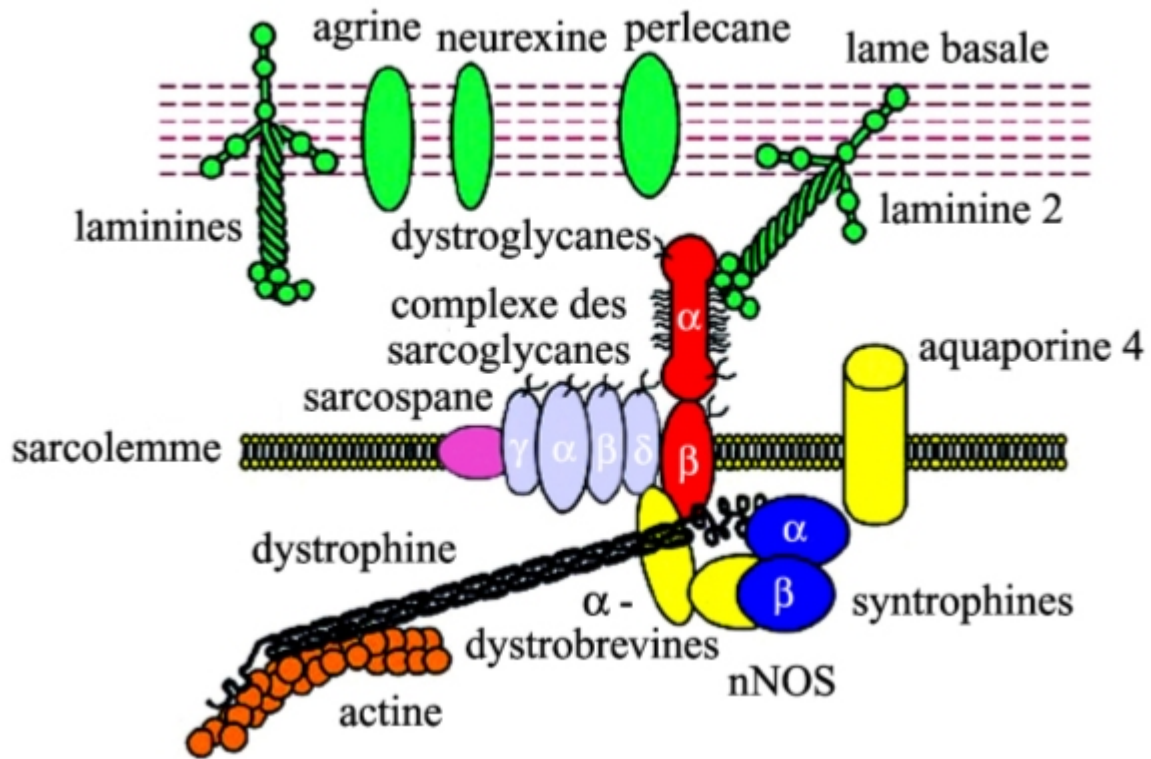


Figure 3 : Représentation schématique du complexe de la dystrophine (Michele and Campbell 2003).

1.2.4 Génétique de la maladie de Duchenne

La dystrophie de Duchenne (DMD) est liée à une anomalie du gène codant pour la dystrophine qui est situé sur le chromosome X à Xp21. Cette anomalie se transmettant de manière récessive, elle affecte principalement les sujets de sexe masculin. Les femmes peuvent être porteuses de l'anomalie génétique, elles peuvent également présenter des signes cliniques de faiblesse musculaire beaucoup moins sévères que la maladie elle-même.

Le gène de la dystrophine est situé sur le bras court du chromosome X. Il est fait de 2.6 millions de paires de bases et de 79 exons, représentant ainsi l'un des gènes les plus longs connus. Seul 0,5% des paires de bases, qui, combinées les unes avec les autres, contiennent la séquence codante pour la dystrophine (Bieber and Hoffman 1990).

La plupart des défauts moléculaires chez les patients atteints de DMD sont des délétions qui constituent environ 60 % des mutations. La distribution des délétions dans le gène est non aléatoire ; certaines régions du gène sont plus sensibles que d'autres; ainsi, les mutations sont plus fréquentes soit à l'extrémité 5' du gène, soit dans la région centrale. Moins souvent, la dystrophie de Duchenne est causée par une duplication ou par une mutation ponctuelle du gène. La mutation peut déplacer le cadre de lecture d'une ou deux lettres, alors, il y a production d'une dystrophine non fonctionnelle à la suite de l'incorporation de plusieurs acides aminés incorrects dans la protéine, et à l'arrêt de la lecture du gène suite à un codant stop prémature. La dystrophine tronquée ne va pas atteindre la membrane cytoplasmique puisqu'elle va être dégradée dans le cytoplasme (Muntoni, Torelli, and Ferlini 2003).

Dans environ 1/3 des cas, il n'y a pas d'antécédents familiaux de dystrophie et l'anomalie génétique n'est pas retrouvée chez la mère, on peut envisager la possibilité d'une néomutation survenue dans la gamétogénèse chez la mère. L'identification de l'anomalie génétique responsable de la DMD permet maintenant de poser un diagnostic fiable par biologie moléculaire et de proposer un conseil génétique. Cependant, le taux des cas

sporadiques rend impossible l'élimination de cette maladie par le conseil génétique (Caskey et al. 1980).

1.2.5 Modèles animaux de la maladie

Le modèle expérimental le plus utilisé actuellement pour l'étude de la DMD est la souris mdx (Muscular Dystrophy X-linked). Cette souris dystrophique a été décrite en 1984, elle présente une absence de la dystrophine, une élévation de créatine kinase plasmatique, ainsi que des lésions spécifiques de la DMD (Bulfield et al. 1984); ce qui fait de cette souris un bon modèle pour étudier la maladie.

Le muscle de la souris mdx, comme les malades Duchenne, possède des propriétés contractiles altérées. En effet, les études physiologiques effectuées sur plusieurs muscles de la souris mdx montrent une diminution de la force musculaire et une augmentation de la fragilité des muscles mdx par rapport aux muscles d'une souris normale. Ces anomalies physiologiques sont liées à l'absence de la dystrophine dans les muscles des souris mdx (Brussee, Tardif, and Tremblay 1997). Cependant, même si la dystrophine est absente, les souris mdx ne présentent pas d'anomalies dégénératives aussi graves que les malades Duchenne, on ne voit effectivement pas d'atteintes des muscles respiratoires ni de cardiomyopathies, et encore moins l'infiltration des muscles par le tissu adipeux et fibreux comme on peut voir chez les malades atteints de la dystrophie de Duchenne.

La souris mdx n'est pas le seul modèle animal de la maladie; en effet, un modèle encore plus proche de l'humain est disponible, c'est le chien dystrophique qui présente une évolution de la maladie très proche de celle de l'humain et qui constitue, sans doute, le meilleur modèle animal pour l'étude de la maladie.

1.2.6 Thérapies envisagées

1.2.6.1 Diagnostic prénatal

Actuellement, c'est la méthode préventive qui est le traitement le plus efficace de la maladie. Le diagnostic prénatal se fait systématiquement chez les familles atteintes. La détection de la maladie pendant la grossesse se fait actuellement par amniocentèse, et compte tenu des risques de cet examen et de la rareté de la maladie, le diagnostic prénatal de toute la population ne présente pas un vrai bénéfice. Si ce diagnostic avait été possible, il ciblerait les patients chez qui la mutation du gène de la maladie n'est pas héréditaire, c'est-à-dire qu'elle apparaît spontanément au cours du développement embryonnaire, cette population ne constitue finalement que 25% du total des malades. Le diagnostic prénatal permet de faire des avortements thérapeutiques en cas de présence de la maladie chez le fœtus (Maheshwari et al. 2000).

1.2.6.2 Traitements disponibles

1 Physiothérapie

Elle permet aux enfants atteints de la maladie de Duchenne de maintenir une position correcte des pieds, par des étirements quotidiens des pieds ou par l'utilisation d'orthèses.

2 Traitements pharmacologiques utilisés

Très peu d'alternatives thérapeutiques sont proposées pour la DMD. Le traitement par les anti-inflammatoires stéroïdiens est le plus utilisé actuellement, leur mode d'action n'est pas connu, mais ils peuvent prolonger la durée de l'autonomie de 2 ou 3 ans. Ce traitement reste cependant symptomatique.

Le Déflazacort est aussi utilisé à la place de la prédnisone car il a moins d'effets secondaires.

3 Traitements chirurgicaux

La chirurgie s'adresse principalement aux malades qui présentent des malformations de la colonne vertébrale comme des scolioses qui sont dues à l'affaiblissement de la charpente musculaire vertébrale. Ils visent à maintenir une posture normale chez les malades.

4 Ventilation artificielle

Les malades Duchenne développent une faiblesse des muscles respiratoires, ce qui conduit à une insuffisance respiratoire qui constitue l'une des principales causes de décès chez les malades. La ventilation assistée reste la seule alternative thérapeutique qui peut être utile chez les malades à ce stade d'évolution.

1.2.6.3 Traitement de la maladie par la thérapie génique

La thérapie génique consiste en l'introduction d'une copie du gène de la dystrophine dans les cellules musculaires des malades atteints de la DMD, ces cellules vont pouvoir ensuite synthétiser de la dystrophine qui va être exprimée au niveau de la membrane cytoplasmique, et ainsi restaurer tout le complexe glycoprotéique associé. Même si le principe de la technique est simple et très logique, la thérapie reste difficile à appliquer dans le traitement de la DMD pour plusieurs raisons. En effet, pour traiter un malade il faut introduire une grande quantité de virus, ce qui n'est pas sans danger. En plus, le malade pourrait produire des anticorps contre les fibres qui expriment la dystrophine. Le deuxième problème rencontré dans l'application de la thérapie dans la maladie de Duchenne, est la grosseur du gène de la dystrophine. En effet, l'ADN complémentaire (ADNc) de la dystrophine est de 14 kb, il est alors très difficile à introduire dans un vecteur viral. Des équipes ont cherché à remédier à ce problème en utilisant de la micro et la mini-dystrophine (Scott et al. 2002).

Le gène peut être introduit directement dans les muscles du patient, c'est la technique *in vivo*. La technique *ex vivo*, quant à elle, consiste en une transplantation de myoblastes génétiquement modifiés dans les muscles du patient. Dans les deux méthodes, pour

introduire le gène de la dystrophine dans les cellules musculaires, deux principaux types de vecteurs sont utilisés: les vecteurs viraux et les vecteurs non viraux ; chacune des approches peut avoir ses avantages et ses inconvénients.

1 Vecteurs viraux

Les virus ont la capacité d'infecter des cellules somatiques afin de faire exprimer leur génome et de se répliquer, cette propriété est utilisée pour introduire le gène de la dystrophine dans les cellules musculaires des patients atteints de la DMD. Plusieurs types de vecteurs viraux sont utilisés dans la DMD.

Adénovirus

Les adénovirus sont connus depuis longtemps chez l'homme, ils causent des infections bénignes comme les infections des voies respiratoires et des conjonctives. Le génome normal du virus est de 36 Kd, ce qui fait que la dystrophine pleine longueur peut entrer facilement dans le vecteur. Avant l'infection, le virus doit reconnaître une protéine de surface nommée "Coxsackie and adenovirus receptor" (Quenneville et al.), l'expression de cette protéine diminue lorsque la fibre musculaire passe au stade mature. Un des plus gros problèmes rencontrés avec les adénovirus est le rejet immunitaire des cellules modifiées génétiquement avec ces virus, la réaction immunitaire est d'autant plus importante que le sujet a déjà été en contact avec ces virus auparavant (Parks 2000).

Virus adéno-associés

Les virus adéno-associés (AAV) peuvent infecter des cellules en division ou des cellules quiescentes comme les cellules musculaires, et ils peuvent incorporer le gène de façon stable. Cependant, la longueur maximale du gène qui peut y être inséré est de 5,2 kb. L'utilisation des versions de la micro ou de la minidystrophine permet l'introduction du gène dans ce vecteur. Des mini-gènes de la dystrophine de moins de 4,2 kb ont pu être introduits dans le vecteur. Après l'injection intramusculaire du vecteur, les dystrophines tronquées produites sont retrouvées dans la membrane cellulaire des souris mdx. Des vecteurs AAVs recombinants injectés en intramusculaire peuvent donner des taux

d'infection très élevés et une capacité à améliorer la pathologie jusqu'à 6 mois après l'administration (Wang, Li, and Xiao 2000).

L'équipe de Chamberlain a réussi à faire exprimer de la micro dystrophine dans le myocarde de souris mdx en faisant des injections en intracardiaque du vecteur AAV (Yue et al. 2003). Récemment, Liu et al. (Liu et al. 2005) ont démontré que l'expression de la microdystrophine chez les souris mdx en utilisant l'AAV, peut résulter d'une protection du muscle contre les contractions excentriques. Cet effet est significatif suite à l'expression de la dystrophine dans 30% des fibres.

Rétrovirus

Ces virus possèdent un ARN simple brin. Ils se répliquent en passant par une transcriptase inverse dans des cellules en division; l'efficacité de transfert du gène dépend alors de la capacité de division des cellules, ce qui fait de la cellule musculaire un mauvais modèle pour l'utilisation de ces vecteurs. En plus, le rétrovirus a une capacité limitée en ce qui concerne la longueur du gène qu'on peut y insérer (7,8 kb); l'utilisation de la mini-dystrophine reste nécessaire pour le traitement de la maladie et donne des résultats peu satisfaisants. En effet, les expériences faites chez les souris dystrophiques utilisant les rétrovirus montrent que même si le pourcentage d'infection in vitro des myoblastes est de 100 %, l'injection du virus directement dans le muscle en régénération ne donne que 0,5-1 % de fibres dystrophine positives. Ce résultat est attribué au fait que les souris ont développé des anticorps contre le rétrovirus, et que la demi-vie du rétrovirus est courte in vivo (Fassati and Bresolin 2000).

Lentivirus

Le lentivirus est une sous classe dérivée du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Ce virus ne peut pas contenir le gène complet de la dystrophine, puisque la longueur du gène qu'on peut y insérer ne doit pas dépasser 9 kb. Cependant, il présente certains avantages, il est capable d'infecter des cellules même quiescentes et reste ensuite quiescent dans les tissus en post mitose sans causer de réaction immunitaire. De plus, ce vecteur intègre le transgène dans le génome des cellules donc lorsque ces cellules prolifèrent, elles

conservent le transgène. Ce qui fait de ce vecteur un choix idéal pour la thérapie ex-vivo par le transfert du gène de la micro-dystrophine dans les cellules souches provenant d'un muscle dystrophique (Scott et al. 2002).

2 Vecteurs non-viraux

Pour éviter tous les problèmes liés l'utilisation des vecteurs viraux, différentes autres approches ont été développées pour exprimer la dystrophine dans les cellules musculaires chez les malades. L'utilisation des plasmides pour délivrer directement le gène de la dystrophine dans le muscle est une des options. Les plasmides peuvent être injectés directement en intramusculaire, en utilisant des adjuvants comme l'électroporation, les ultrasons, la co-injection d'enzymes comme les hyaluronidases (Rando 2006). Parmi toutes ces méthodes, l'électroporation paraît être la plus efficace, cependant, elle entraîne un grand dommage pour le muscle. Les plasmides peuvent également être injectés en intra-artériel ; chez la souris mdx cette technique a donnée 1-5% de fibres dystrophine positives (Zhang et al. 2004).

Une nouvelle méthode permet de traiter spécifiquement chaque malade après avoir identifié la mutation dans le gène de la dystrophine. Le saut d'exons permet en agissant directement sur l'ARNm soit d'éliminer un exon contenant une mutation non-sense soit de rétablir le cadre de lecture de gène en éliminant un ou deux exons avant ou après une délétion et par conséquent permet la production de la protéine manquante. Cette protéine est partiellement tronquée puisqu'il lui manque des parties codées par les exons éliminés. Cette technique vise alors à traiter spécifiquement chaque malade, puisque le diagnostic exact de la mutation est nécessaire pour la construction d'un vecteur spécifique (Rando 2006). Une des limitations du saut d'exon est le fait que l'effet de la thérapie est transitoire s'il est produit par un oligonucléotide; en effet, chez la souris mdx, la thérapie donne de bons résultats, il y a une restauration de la dystrophine avec tout le complexe associé, avec peu de réaction immunitaire; cependant, l'expression de la dystrophine dans les muscles traités dure en moyenne 3 mois (Lu et al. 2003). Il est cependant possible de produire un saut d'exon permanent en infectant des cellules précurseurs du muscle (myoblastes) ou les fibres musculaires elles-mêmes avec un vecteur lentiviral codant pour un antisense induisant le

saut d'un exon. Cette approche thérapeutique a récemment été validée par le laboratoire du Dr Tremblay (Quenneville 2006)

1.2.6.4 Approches par la thérapie cellulaire

1 La transplantation de myoblastes

Le principe générale de cette thérapie est de transplanter des myoblastes dans les muscles dystrophiques, ces cellules vont pouvoir ensuite fusionner avec les fibres musculaires malades et créer de nouvelles fibres qui expriment la dystrophine (Partridge 1991). Les myoblastes sont des cellules qui existent à l'état normal autour d'une fibre musculaire et dont le rôle est de réparer le muscle en cas de dommage. Le but de cette thérapie est de créer une nouvelle fibre musculaire hybride qui est faite de la fusion de la fibre musculaire malade et des myoblastes normaux, cette nouvelle fibre va exprimer non seulement de la dystrophine mais contient également des noyaux normaux (figure 4) (Huard et al. 1993).

L'équipe de Partridge a été la première à démontrer que la transplantation de myoblastes d'un receveur pouvait participer à la réparation des fibres musculaires du donneur (Partridge, Grounds, and Sloper 1978).

D'autres équipes ont commencé à essayer d'appliquer cette méthode dans le traitement de la maladie de Duchenne en utilisant les souris mdx. Ainsi, Partridge et ses collaborateurs ont démontré que la transplantation de myoblastes normaux chez les souris mdx conduit à l'expression de la dystrophine au niveau des fibres musculaires (Partridge et al. 1989). Ces chercheurs ont aussi démontré que l'élimination des cellules satellites de l'hôte par l'irradiation permet des meilleurs succès de greffe, puisque les fibres musculaires du receveur sont réparées exclusivement par les myoblastes du donneur (Morgan, Hoffman, and Partridge 1990). Le succès de la greffe a été mesuré, et l'est encore, par le nombre de fibres exprimant de la dystrophine qu'on arrive à identifier par immunohistochimie en utilisant un anticorps contre la dystrophine sur les coupes des muscles greffés.

Les myoblastes greffés peuvent soit provenir d'un donneur sain, ce qui implique que l'utilisation d'un immunosuppresseur est importante pour que les myoblastes ne soient pas rejetés ; soit à partir du malade lui-même. Dans ce dernier cas, les cellules doivent être corrigées génétiquement en ex-vivo pour exprimer de la dystrophine et ensuite réinjectées, ce qui permet d'éliminer les problèmes de rejet.

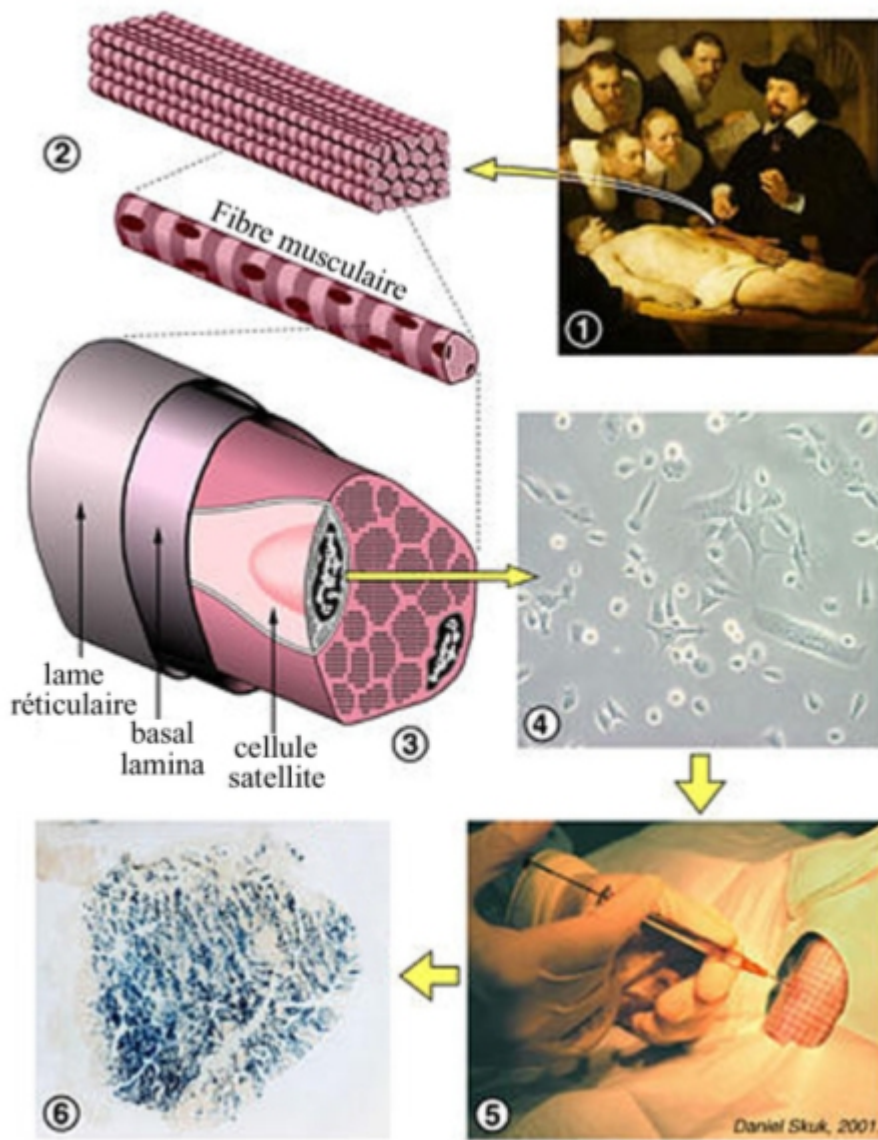


Figure 4 : Représentation du principe de la transplantation de myoblastes.

(1) Le tissu musculaire est prélevé d'un donneur. (2 et 3) représentation des fibres musculaires et des cellules satellites autour des fibres. (4) Photo d'une culture de cellules satellites. (5) Injection des cellules satellites dans le muscle. (6) Coupe transverse d'une biopsie du muscle biceps d'un singe greffé avec des cellules marquées à la β -galactosidase (Skuk et Tremblay 2000).

Essais cliniques de transplantation de myoblastes chez l'humain

Après les essais chez la souris, qui ont donné beaucoup d'espoirs pour le traitement de patients atteints de la maladie de Duchenne, plusieurs équipes de recherche se sont lancées dans des expériences chez les humains au début des années 90 (Law et al. 1990; Huard et al. 1991; Gussoni et al. 1992; Karpati et al. 1993; Tremblay et al. 1993; Miller et al. 1997). Les premiers résultats chez l'humain ont été malheureusement assez décevants. Ainsi, l'équipe de Karpati, suite à un essai clinique avec utilisation transitoire de la cyclophosphamide pendant 6 ou 12 mois a conclu que la thérapie est inefficace pour le traitement de la maladie chez l'humain (Karpati et al. 1993). Plus tard, l'équipe de Tremblay a pu démontrer que cet échec est attribuable à l'effet de la cyclophosphamide qui tue les cellules en prolifération, y compris les myoblastes transplantés (Vilquin, Kinoshita et al. 1995).

L'équipe de Miller, quant à elle, a détecté la présence du messager de la dystrophine dans les muscles traités chez trois des 10 patients traitées après 1 mois de la greffe, puis chez 1 seul patient après 6 mois, l'expression était très faible. Cependant, l'équipe a remarqué une amélioration de la force des muscles traités. Cette amélioration de la force est attribuée à l'utilisation de la cyclosporine qui a comme effet d'augmenter le calcium en intracellulaire et donc une amélioration de la fonction musculaire. Ce gain de force n'a donc pas été attribué à la transplantation de myoblastes (Miller et al. 1997).

Les premières études effectuées chez l'homme ont démontré le besoin de retrouver les failles de la technique et de l'améliorer. L'équipe de Jacques Tremblay a obtenu des résultats satisfaisants: la restauration de la dystrophine dans les muscles greffés était significative, l'étude a été effectuée sur cinq garçons atteints de la maladie sans utiliser d'immunosuppresseur, 1 mois plus tard de 0 à 36% de fibres dystrophine positives ont été détectées dans le muscle greffés (Tremblay et al. 1993). Cependant, cette expression a été temporaire secondairement au rejet immunitaire, des anticorps contre la dystrophine ont été retrouvés dans la circulation de certains malades. Huard et al ont transplanté des myoblastes provenant de donneurs compatibles, chez 4 patients atteints de la DMD. Les résultats ont

été impressionnants, l'expression de la dystrophine a atteint 80 % et certains patients ont même montré une amélioration de la force musculaire suite à la greffe (Huard et al. 1992). La conclusion de cet essai a été que la transplantation de myoblastes ne peut pas se faire sans utiliser l'immunosuppression.

L'équipe du Dr. Tremblay a complété un nouvel essai clinique phase I chez 9 patients atteints de la maladie de Duchenne. Les malades ont été traités par le FK506 et ont reçu des greffes de 30 millions de myoblastes injectés à 1 à 2 mm d'intervalle. Quatre semaines après la greffe, des biopsies des muscles greffés ont montré une expression de la dystrophine dans 3,5 à 26 % des fibres musculaires dans les régions de la greffe. Ce résultat vient confirmer que la transplantation de myoblastes peut induire l'expression de la dystrophine dans la DMD chez l'humain (figure 5) (Skuk, Goulet, Roy, Chapdelaine et al. 2006). Plus récemment, un patient de 26 ans atteint de la dystrophie musculaire de Duchenne a reçu plusieurs injections de myoblastes normaux dans le muscle de l'éminence thénar, le biceps brachial et le gastrocnemius; les injections ont été espacées de 1 mm. Des biopsies des différents sites d'injections ont été faites à 1, 14 and 18 mois après la transplantation. Dans le muscle gastrocnemius, 34.5% de fibres dystrophine positives ont été retrouvées 18 mois après la greffe. Ceci vient confirmer que la transplantation de myoblastes peut entraîner une expression de la dystrophine à long terme (Skuk, Goulet, Roy, Piette et al. 2006).

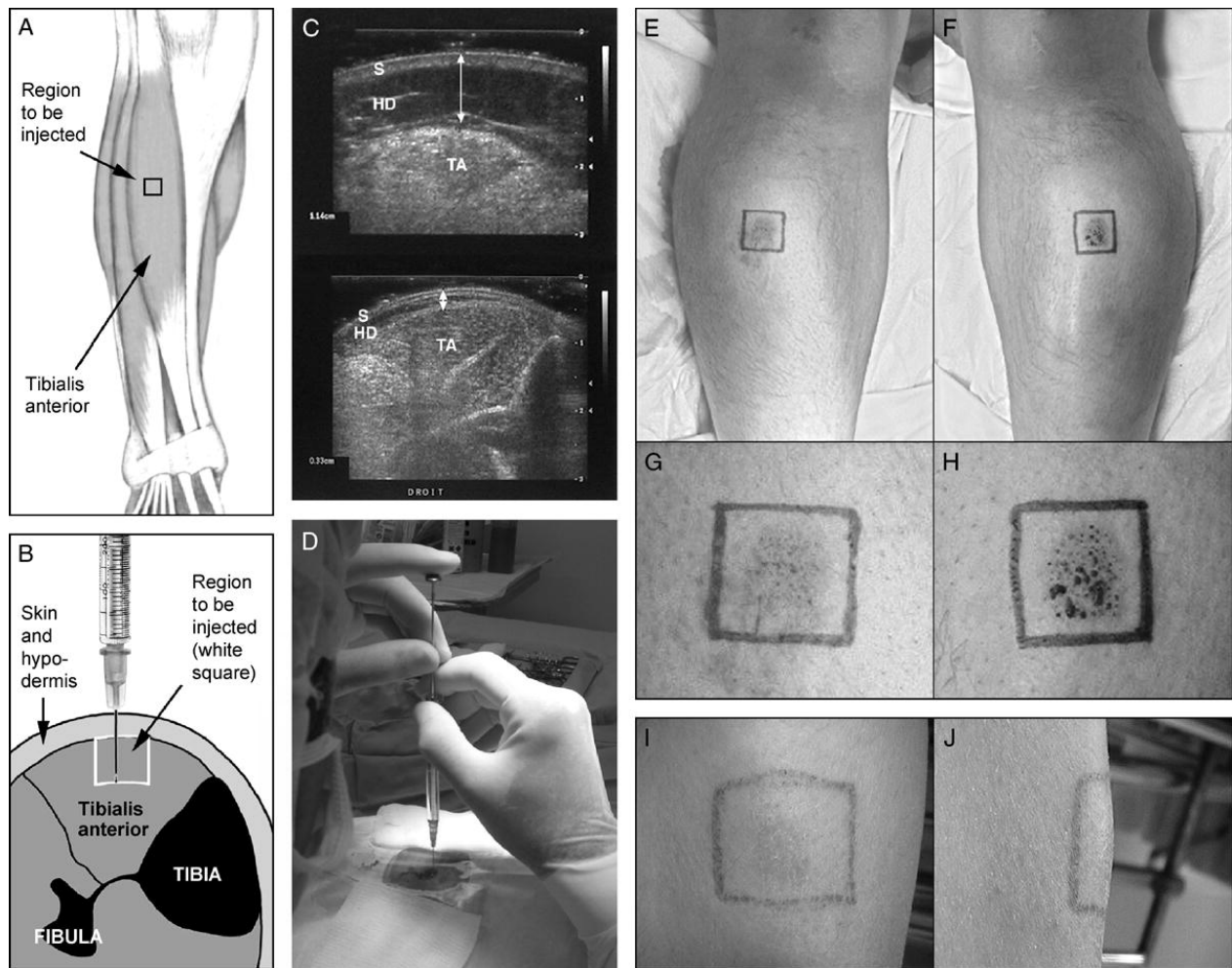


Figure 5: Illustration de la technique de greffe de myoblastes chez l'humain. (A) L'injection des cellules satellites se fait dans le Tibialis antérieur. (B) Les injections des cellules se fait par voie percutanée. (C) Les injections ont été procédées d'une échographie afin de déterminer la distance entre le muscle et la peau. (D) Les injections ont été faites manuellement en utilisant une seringue Hamilton. (E-H) Photo du site d'injection immédiatement après la procédure. (Allbrook 1981) Vue de face et de profil du site d'injection chez un patient (Skuk, Goulet, Roy, Chapdelaine et al. 2006).

Limites de la transplantation de myoblastes

Les résultats médiocres de la thérapie dans les premiers essais cliniques ont été un témoignage de la mise au point défailante de cette thérapie. A partir de là, plusieurs équipes ont commencé à chercher les raisons de cet échec et d'essayer trouver la façon d'améliorer la technique. Parmi ces équipes, celle de Jacques Tremblay a étudié la transplantation de myoblastes chez des souris dystrophiques et ensuite chez les singes en utilisant le plus possible des conditions applicables à l'humain et en tentant de trouver des solutions pour améliorer la technique. Cette équipe a identifié trois types de problèmes pouvant survenir dans le cas d'une transplantation de myoblastes (Skuk and Tremblay 2000, 2003) :

- le rejet à moyen et long terme dû à la réponse immune spécifique.
- la faible migration des myoblastes hors des sites d'injections.
- la mort rapide des myoblastes suite à l'injection (figure 6).

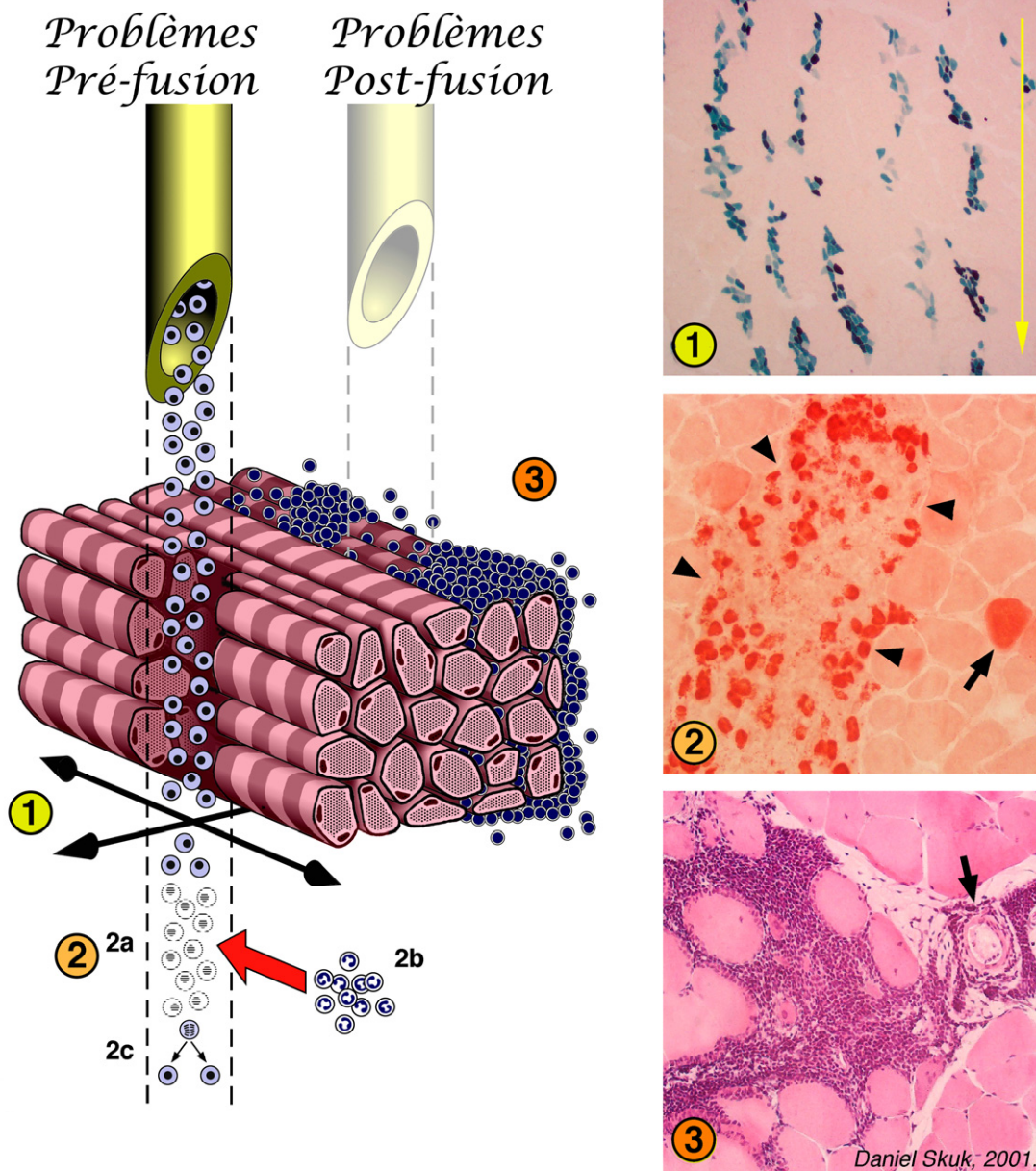


Figure 6 : Représentation schématique des trois principaux problèmes de la transplantation de myoblastes. En (1), la faible migration des myoblastes, les cellules restent confinées aux trajectoires d’injection. En (2), coloration à l’Alizarine red montrant la mort des myoblastes après une transplantation. En (3), la réaction immunitaire secondaire à une transplantation allogénique de myoblastes (Skuk et Tremblay 2001).

Solutions apportées pour améliorer la greffe de myoblastes

1 Lutter contre le rejet immunitaire

L'une des premières explications qu'on a donnée suite à l'échec des premiers essais cliniques chez l'homme est le rejet des myoblastes par le système immunitaire de l'hôte. Chez certains patients, des anticorps contre la dystrophine ont été détectés dans le sang des malades. En effet, comme toute transplantation allogène, la survie des cellules greffées dépend de la neutralisation du système immunitaire des malades. La première solution proposée, est d'immunosupprimer le receveur à long terme après une greffe de myoblastes. L'immunosuppresseur choisi ne doit pas interférer dans la réplication et la fonction des myoblastes. Plusieurs drogues ont été essayées ; l'utilisation de la cyclophosphamide pour la transplantation de myoblastes chez la souris ne permet pas d'avoir un bon succès de greffe (Vilquin, Kinoshita et al. 1995). La drogue qui a montré le plus d'efficacité est le Tacrolimus (FK506), elle a donné de très bons résultats aussi bien chez la souris que chez le singe (Kinoshita et al. 1994; Kinoshita et al. 1996). Dans les essais cliniques actuels, le FK506 est utilisé et est également bien toléré.

La limite de cette alternative réside dans la grande toxicité des immunosuppresseurs, surtout que les malades doivent les utiliser à vie. Cette toxicité dépend du type d'agent et de la dose utilisés. Le traitement par le tacrolimus peut exposer les malades à une néphrotoxicité, une neurotoxicité peut également être observée surtout suite à des injections intraveineuses de la drogue. Le tacrolimus est également diabétogène et augmente aussi les risques de cancer.

Pour éviter d'utiliser les agents immunosuppresseurs, plusieurs protocoles d'induction de la tolérance ont pu être développés dans différents laboratoires. Plusieurs protocoles ont été développés dans notre laboratoire visant à prolonger la tolérance de la greffe des myoblastes sans pour autant utiliser des agents immunosuppresseurs à long terme. Certains protocoles ont utilisé des anticorps monoclonaux dont l'administration permet d'inhiber la signalisation entre les lymphocytes. Guerette et al ont utilisé des anticorps monoclonaux anti-lymphocytes et la molécule recombinante (CTLA4-Ig) dans la transplantation de

myoblastes, cette technique a démontré une bonne efficacité à court terme, mais les myoblastes finissaient pas être rejetés à long terme (Guerette et al. 1997).

L'induction d'une tolérance centrale est une autre alternative, elle vise à introduire les cellules souches médullaires du donneur dans la moelle osseuse du receveur, ceci va créer un chimérisme mixte et va permettre par la suite de faire des greffes. Camirand et al ont obtenu une tolérance centrale en utilisant une faible dose d'irradiation et les anti-CD154 ou les anti-CD45RB mAbs combinés à une greffe de moelle (Camirand et al. 2004). Un protocole de chimérisme central utilisant la cyclophosphamide et le tréosulfan a été développé dans notre laboratoire et donne de très bons résultats chez les souris, l'avantage de ce protocole est la réduction de la toxicité, puisqu'il n'utilise pas de radiothérapie. Les essais chez le singe et chez le chien sont en cours.

Les protocoles de tolérance périphérique visent à induire une reconnaissance des cellules du donneur par le système immunitaire du receveur comme étant des cellules du soi. Pour cela certaines cellules du système immunitaire sont visées comme les lymphocytes T régulateurs dont le rôle, comme leur nom l'indique, est de réguler la réponse immunitaire. Ces cellules peuvent être éduquées par plusieurs méthodes pour induire une tolérance aux antigènes du donneur.

L'induction de la tolérance centrale ou périphérique constitue un véritable espoir aussi bien pour la transplantation de myoblastes que pour différentes transplantations d'organes utilisées chez l'homme. Malheureusement, le succès d'une thérapie chez la souris ne garantit pas un succès chez l'homme, et ces protocoles doivent d'abord être testés chez des animaux supérieurs avant de pouvoir être testés en clinique.

La thérapie génique ex-vivo peut minimiser considérablement la réponse immunitaire. Les myoblastes du patient sont prélevés puis transformés génétiquement pour exprimer la dystrophine, et ensuite réinjectés chez le patient. Quenneville et al. ont utilisé la nucléofection pour introduire un plasmide contenant le gène de la dystrophine dans les

myoblastes d'humains et de souris. Ils ont pu avoir des bons résultats de transfection, avec une expression stable du gène dans les cellules transfectées(Quenneville et al. 2004).

2 Migration des myoblastes hors des sites d'injections

Une fois injectés dans le muscle, les myoblastes ne migrent presque pas et restent confinés aux trajets d'injections en réparant les fibres qui se brisent suite à l'injection elle-même (Skuk and Tremblay 2000). La seule façon d'avoir un bon succès de greffe est de faire des injections de myoblastes très rapprochées ; des injections à 1 mm d'intervalle permettent d'avoir un succès de greffe de 25 à 67 % chez les primates (Skuk et al. 2002). La faible migration des myoblastes constitue un véritable obstacle à l'application de la thérapie chez l'humain, vu le nombre de muscles qu'il faut greffer et le temps nécessaire pour réaliser toutes ces greffes. Par conséquent, l'augmentation de la capacité de migration des cellules satellites devient nécessaire pour diminuer le nombre de trajectoires d'injection, et pour que la thérapie soit applicable facilement chez l'humain.

Le traitement de la culture de myoblastes avec la concanavaleine A 2 jours avant l'injection entraîne une augmentation de plus de trois fois de la migration des cellules par rapport au contrôle non greffé (Ito et al. 1998). Cette molécule entraîne une augmentation de l'expression des métalloprotéases, protéines impliquées dans la locomotion cellulaire et qui sont exprimées fortement dans les cellules tumorales invasives. L'induction d'une surexpression des l'urokinase plasminogène par les myoblastes, une molécule du système fibrinolytique, augmente considérablement leur capacité à migrer dans le muscle suite à une transplantation (El Fahime et al. 2002). Notre équipe de recherche travaille également sur les facteurs de croissance tels que l'IL-4, l'IGF-I et le bFGF pour stimuler la dispersion radiale des myoblastes ; la co-injection de myoblasts avec l'IGF-I et le bFGF *in vitro* ou *in vivo* (chez la souris) augmente leur motilité et leur capacité invasive (Lafreniere et al. 2004).

3 Augmenter la fusion des myoblastes

Après une transplantation de myoblastes et pour avoir un bon succès de greffe, il est nécessaire d'induire une fusion des myoblastes injectés avec les fibres musculaires du muscle dystrophique. Le moyen le plus efficace est la création d'un bris musculaire dans les fibres du receveur au moment de l'injection des myoblastes ; ces cellules vont pouvoir ensuite réparer les fibres brisées ce qui va créer de nouvelles fibres hybrides qui expriment la dystrophine. La méthode la plus utilisée par notre laboratoire est la notexine ou la cardiotoxine qui sont injectées en même temps que les myoblastes.

La deuxième approche pour augmenter la fusion des myoblastes transplantés est d'éliminer les myoblastes de l'hôte pour diminuer leur compétition avec les myoblastes greffés. L'utilisation de l'irradiation permet considérablement d'augmenter le succès de la greffe.

4 Lutter contre la mort rapide des myoblastes suite à l'injection

Une fois injectés, 70 % des myoblastes meurent 3 jours heures après la greffe, cette mort peut être expliquée par plusieurs facteurs, en cibler un ou deux ne permet pas d'avoir une grande amélioration de la survie. Une des explications possibles est la réponse immunitaire spécifique contre les myoblastes, cependant, la mort rapides des myoblastes suite à la transplantation est également observée dans les greffes chez les souris non immunocompétentes (Skuk and Tremblay 1998). Les deux autres explications sont les phénomènes d'apoptose et de nécrose des cellules qui surviennent après la transplantation (Skuk and Tremblay 2000). L'équipe du Dr. Tremblay a démontré que l'induction de la sécrétion de la Heat-shock protéines (HSPs) dans les myoblastes de la souris avant de les transplanter induit une diminution de la mort des myoblastes et donc un meilleur succès de greffe (Bouchentouf, Benabdallah, and Tremblay 2004).

2 Transplantation de cellules souches pluripotentes

La découverte de la possibilité de l'utilisation des cellules souches pour le traitement de la maladie de Duchenne remonte à quelques années. Plusieurs équipes de recherche ont commencé à s'intéresser aux cellules souches et à leur potentiel pour traiter la maladie de Duchenne.

Les cellules souches musculaires peuvent non seulement former des fibres musculaires mais peuvent également repeupler la moelle osseuse. Jackson et al ont démontré que ces cellules souches présentent des caractéristiques semblables aux cellules souches hématopoïétiques et qu'elles peuvent repeupler la moelle osseuse (Jackson, Mi, and Goodell 1999). Ces cellules auraient un potentiel supérieur aux cellules satellites pour la réparation du muscle squelettique chez la souris (Huard, Cao, and Qu-Petersen 2003). Plus récemment, la même équipe a démontré que les cellules souches musculaires sont capables de former des cardiomyocytes exprimant de la dystrophine chez des souris mdx (Payne et al. 2005).

L'utilisation des cellules souches apporte plusieurs avantages pour le traitement de la maladie. En 1995, il a été démontré que les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse peuvent se transformer en progéniteurs du muscle et peuvent éventuellement participer à la régénération musculaire (Wakitani, Saito, and Caplan 1995). L'équipe de Gussoni a montré qu'après des injections systémiques chez des souris mdx, ces cellules peuvent participer à la régénération musculaire; cependant, moins de 1% de fibres exprimait la dystrophine (Gussoni et al. 1999). L'injection de ces cellules en systémique représente un énorme avantage par rapport à la transplantation de myoblastes, elle éviterait au patient les nombreuses chirurgies et en plus on peut espérer que ces cellules puissent atteindre les muscles respiratoires et cardiaque, ce qui va prolonger la durée de vie des patients en retardant ou même en évitant l'insuffisance cardiaque et respiratoire. Cependant, leur efficacité à régénérer le muscle reste très limitée, compte tenu du nombre médiocre de fibres dystrophine positives qu'elles peuvent former. Chez un enfant atteint de la maladie de Duchenne et qui avait bénéficié d'une transplantation de moelle d'un donneur

normal suite à un déficit immunitaire, des biopsies musculaires ont révélé des fibres qui contiennent des noyaux du donneur quelques années après la greffe. Encore une fois, le pourcentage de fibres hybrides était de 0,5 à 0,9 % (Gussoni et al. 2002).

1.3 Études des propriétés contractiles musculaires de la souris mdx

La souris mdx est sans doute le modèle expérimental le plus utilisé pour l'étude de la maladie de Duchenne. Contrairement à l'humain, la souris mdx ne présente pas d'involution fibreuse et grasseuse des muscles. Cependant, les études des propriétés contractiles des muscles des souris mdx ont prouvé qu'ils présentent une force spécifique inférieure et sont plus fragiles que les muscles d'une souris normale (Brussee, Tardif, and Tremblay 1997; Irintchev, Zweyer, and Wernig 1997; Moens, Baatsen, and Marechal 1993; Vilquin et al. 1998; Dellorusso et al. 2001). Ce qui fait de cette souris un bon modèle pour l'étude des effets de la greffe de myoblastes dans un muscle atteint de la dystrophie de Duchenne. De plus, la mesure de la force totale d'un muscle mdx et d'une souris normale montre qu'il n'y a pas de différence, ou même que le muscle d'une souris mdx peut paraître plus fort que celui d'une souris normale. Cependant, comme la souris mdx présente une hypertrophie musculaire par rapport à une souris normale du même sexe et du même âge, sa force spécifique est par conséquent inférieure à celle des souris normales pour la même fréquence de stimulation (Dellorusso et al. 2001).

La fragilité musculaire chez la souris mdx vient du fait que les fibres musculaires se brisent plus facilement par rapport à une souris normale. Brussee et al ont testé l'effet de l'exercice physique sur différents muscles de la souris mdx et de la souris normale et ont conclu que chez la souris mdx, près de 30 % plus de fibres ont été endommagées suite à l'exercice physique, un des muscles les plus touchés est le diaphragme (Brussee et al. 1998).

L'étude de la réponse des muscles mdx aux contractions excentriques montre qu'ils se brisent plus facilement par rapport aux muscles de la souris normale (Moens, Baatsen, and Marechal 1993). Cette fragilité musculaire est retrouvée chez les patients et est expliquée

par l'absence de la dystrophine qui est une protéine de structure, ce phénomène explique parfaitement la symptomatologie de la maladie.

Cependant, il y a très peu d'études qui ont pu démontrer que la restauration de la dystrophine dans le muscle de la souris mdx peut entraîner une amélioration des propriétés contractiles des muscles mdx., Brussee et al. ont démontré que la greffe de myoblastes entraîne une diminution du dommage induit par l'exercice physique chez les souris. Cependant, la quantité de dommage dans ce type d'études peut varier d'une souris à une autre dépendamment de la vitesse à laquelle la souris peut courir, et on remarque de gros écart types dans le même groupe de souris. Les résultats obtenus étaient basés sur des études cytologiques des fibres musculaires endommagées après un effort physique, et ne donne pas une vraie idée sur la force du muscle étudié (Brussee et al. 1998).

L'étude des propriétés contractiles a aussi déjà été faite sur des muscles mdx traités par thérapie génique qui vise également à restaurer l'expression de la dystrophine dans ces muscles à l'aide de virus adéno-associés (AAV) injectés directement dans le muscle. Le groupe de Chamberlain a pu démontrer que la restauration de l'expression de la micro-dystrophine dans un muscle mdx entraîne effectivement une amélioration de ses propriétés contractiles en augmentant sa résistance contre le stress induit par des contractions excentriques. La restauration de la dystrophine dans ces muscles a été estimée à 30%, ce qui veut dire qu'on n'a pas besoin de restaurer la dystrophine dans toutes les fibres d'un muscle pour avoir une amélioration fonctionnelle (Liu et al. 2005).

1.4 Hypothèse générale

L'équipe du Dr Tremblay a pu prouver une efficacité partielle de la transplantation de myoblastes dans le traitement de la maladie de Duchenne. Les cellules transplantées ont en effet fusionné avec les fibres musculaires de l'hôte et aussi induit la formation de fibres hybrides qui expriment la dystrophine. Le but de ce traitement est d'augmenter la force et la résistance des muscles greffés pour permettre aux patients d'avoir une meilleure qualité de

vie. Cependant, peu d'études ont essayé de prouver que cette thérapie a effectivement un effet sur les propriétés contractiles des muscles greffés. Le but de ce travail est de vérifier si la transplantation de myoblastes peut induire une amélioration des propriétés contractiles des muscles de la souris mdx.

On a choisi de faire nos études sur le muscle *Extensor digitorum longus* (EDL) qui est un muscle minuscule qui pèse une dizaine de milligrammes situé derrière le muscle Tibialis antérieur. Le choix de ce muscle vient du fait qu'il a deux tendons, supérieur et inférieur, ce qui va faciliter son insertion au niveau de l'appareil de mesure sans l'endommager. Le deuxième avantage, c'est que ce muscle présente une susceptibilité aux contractions excentriques contrairement à d'autres muscles, comme le Soleus, et ceci est dû au fait qu'il est constitué essentiellement de fibres à contraction rapide (Moens, Baatsen, and Marechal 1993).

Les études des propriétés contractiles des muscles donnent des résultats plus précis sur le comportement des muscles de la souris mdx. Ces études se pratiquent généralement *in vitro*, les muscles sont soit extraits à partir de la souris, puis placés un bain contenant une solution nutritive, soit laissés en place. Les muscles sont ensuite stimulés à l'aide d'électrodes. Ces études portent généralement sur deux aspects :

- L'étude de la force totale et spécifique d'un muscle : dans ce cas les muscles sont stimulés à différentes fréquences, le but étant de mesurer la réponse des muscles et d'avoir une idée sur le potentiel contractile des fibres musculaires qui le constituent. Donc plus un muscle est gros plus il va produire de force pour la même fréquence de stimulation.
Pour normaliser les résultats et surtout si on veut étudier la force du même muscle chez différents groupes de souris, l'étude de la force spécifique devient nécessaire. Elle est obtenue en divisant la force totale par la surface d'une coupe transverse au centre du muscle étiré à une longueur optimale (Liu et al. 2005).

- L'étude de la réponse du muscle aux contractions excentriques : les contractions excentriques induisent un dommage aux fibres musculaires. Le muscle est stimulé, et dès qu'il atteint un plateau de contraction, il est étiré en même temps. Plus un muscle est fragile plus le nombre de fibres brisées va être grand après ce type de contractions. Après la répétition de plusieurs cycles de contractions excentriques, on mesure après chaque contraction la force totale du muscle, ce qui va permettre d'évaluer le dommage qu'a subi le muscle. Ce type de protocole est très intéressant puisqu'il permet d'avoir une mesure de la fragilité d'un muscle suite à un dommage (Warren, Lowe, and Armstrong 1999).

Mon travail de thèse a donc pour but de tester les propriétés contractiles de muscles *Extensor digitorum longus* chez les souris mdx et des souris normales, et d'étudier des groupes greffés et non greffés pour déterminer les effets de la transplantation de myoblastes sur la force totale et de la résistance des fibres aux contractions excentriques. Il apporte des données importantes et met en évidence les effets de la thérapie sur les propriétés contractiles des muscles greffés.

Chapitre 2: Dystrophin expression following the transplantation of normal muscle precursor cells protects mdx muscle from contraction-induced damage

Saloua Tagmouti, Simon P. Quenneville, Claude H. Côté, Jacques P. Tremblay

1- Unité de recherche de recherche en Génétique Humaine, Centre de recherche de CHUL, CHUQ, Faculté de médecine, Université Laval, Sainte-Foy, Québec, Canada.

2- Unité CRML, Centre de recherche du CHUL, CHUQ, Faculté de médecine, Université Laval, Ste-Foy, QC, Canada

Correspondence should be addressed to:

Jacques P. Tremblay, Ph.D.

Unité de recherche en Génétique Humaine

Centre de recherche du CHUL,

2705, Boulevard Laurier,

Sainte-Foy, Québec,

G1V 4G2, Canada.

E-mail: Jacques-P.Tremblay@crchul.ulaval.ca

Tél : (418) 654-2186

Fax : (418) 654-2207

This work was supported by a fellowship (F.M) and grants from the Association Française contre les Myopathies, and grants from the Muscular Dystrophy Association from Canada, and the Medical Research Council.

2.1 Abstract

Duchenne muscular Dystrophy (DMD) is the most frequent muscular dystrophy. Currently, there is no cure for the disease. The transplantation of muscle precursor cells (MPCs) is one of the possible treatments; since it can restore the expression of dystrophin in DMD muscles. In this study, we illustrate the effect of this therapy on the contractile properties and resistance to eccentric contractions of transplanted and non-transplanted muscles, and we used the *Extensor digitorum longus* as a model for our study.

We concluded that MPC transplantation could insure a better protection from damage induced by eccentric contractions, and more importantly that this effect could not be explained only by the expression of dystrophin in the mdx muscle. The MPC transplantation in mdx muscles can not only induce the expression of dystrophin, but can also improve its contraction properties.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy; *mdx*; MPC transplantation; muscle contraction.

2.2 Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most frequent inherited lethal muscle-wasting disease; it affects 1 of 3500 newborn boys worldwide. Patients are usually diagnosed between 3 and 5 years of age. Early symptoms of delayed walking and unsteady gait rapidly progress to general muscle wasting, first affecting the muscles of the hips, pelvic area, thighs and shoulders (Bushby, Hill, and Steele 1999; Eagle et al. 2002; Sussman 2002). Heart and breathing muscles are also affected. By age 12, 95% of patients are confined to a wheelchair and most of them develop severe scoliosis. In the natural course of the disease, survival is rare beyond the early 20s, most likely because of respiratory and heart failure (Matsuoka et al. 1987). The current treatment options for DMD patients focus primarily control some of the consequences of the disease, slow down for a few years the muscle weakness, and prolong life expectation (Biggar et al. 2002).

DMD is caused by a mutation in the dystrophin gene located on the X chromosome (Koenig et al. 1987). Dystrophin is a 427 kD protein, localized under the sarcolemma of the myofibers and cardiomyocytes, and it is an essential component of the dystrophin glycoprotein complex (Bonilla et al. 1988; Hoffman, Brown, and Kunkel 1987; Hoffman et al. 1988; Rando 2001). The lack of dystrophin results in the absence of the entire complex. Its physiological role would be to provide mechanical stability and maintain membrane integrity during normal contraction. Consequently, lack of dystrophin in muscles of DMD patients is responsible for an increased fragility of myofibers and repeated cycles of degeneration and regeneration, which induce muscle atrophy (Dellorusso et al. 2001; Irintchev, Zweyer, and Wernig 1997; Schmalbruch 1984).

Mdx mice have extensively been used as a model of DMD. A consequence of the lack of dystrophin in mdx muscles is an increased frequency of damaged myofibers compared to normal mice, and this is increased following for example an eccentric contractions or experimental lengthening contractions (Brussee, Tardif, and Tremblay 1997; Dellorusso et al. 2001; Irintchev, Zweyer, and Wernig 1997; Menke and Jockusch 1991; Moens, Baatsen, and Marechal 1993; Vilquin et al. 1998).

Transplantation of normal muscle precursor cells (MPCs) is one of the possible treatments of the disease (Chen et al. 1992; Grounds 1996; Law et al. 1993). Incorporation of normal MPCs in DMD myofibers leads to the expression of the dystrophin in region where they fuse. In previous mouse studies, many research teams have shown that MPC transplantation led to expression of dystrophin or of a reporter gene (present in the donor MPCs) in the fibers in the injected muscles (Kinoshita et al. 1994; Mendell et al. 1995; Skuk et al. 2000; Sussman 2002; Vilquin, Wagner et al. 1995).

Even if MPC transplantation could be a potential therapy for DMD; several important questions remain to be answered regarding the functional consequences of MPC transplantation. Previous studies have tried to answer these questions. Brussee et al. reported that MPC transplantation in *Biceps brachii* of *mdx* mice, resulting in at least 40% dystrophin positive fibers, significantly reduced the damage induced by exercise in the grafted muscle (Brussee et al. 1998). Wernig et al. studied the function of irradiated soleus after MPC transplantation; cell-transplanted muscles produced considerable higher twitch and tetanic forces compared with sham-injected muscles (Wernig, Zweyer, and Irintchev 2000). However, it is still unknown whether normal-MPC transplantation and the consequent dystrophin expression improves the *mdx* muscle-specific force and protects *mdx* muscle from contraction-induced injury. To address these issues, we transplanted normal MPCs in the *extensor digitorum longus* (EDL) muscle of young (2 months old) *mdx* mice and performed functional assays on muscle contractility.

2.3 Material and methods

2.3.1 Materials

Fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), Hank's balanced salt solution (HBSS) and penicillin–streptomycin were obtained from Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada). Collagenase was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO) and dispase II from Boehringer Mannheim (Ontario, Canada), Anti-rabbit antibody coupled to ALEXA 546 was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR), and

polyclonal rabbit anti-dystrophin was produced in our laboratory. FK506 was a gift from Fujisawa Pharmaceutical co. ltd. (Osaka, Japan)

2.3.2 Mouse MPC culture

Primary muscle-cell cultures were prepared from C57BL/10J normal and C57BL10J mdx/mdx mice (2 to 3 days old). Briefly, mice were killed by hypothermia; muscles were dissected from arms and legs, and then were cut into small fragments that were digested with collagenase and dispase II at 37°C for 1 hour. The cell suspension was grown in DMEM supplemented with 10% FBS and a mixture of penicillin G (10,000 IU/ml) and streptomycin (10 mg/ml). The cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. A pre-plating of 2 hours was performed to discard most of the fibroblasts. After 2 days in culture, cells were frozen in nitrogen until transplantation. Desmin labelling was performed to investigate the percentage of MPCs (approximately 50% of desmin-positive cells).

2.3.3 MPC transplantation

The day of transplantation, cells were thawed and washed in DMEM containing 10% FBS and resuspended in 10 µl of notexin (5 µg/ml) in HBSS. The EDL was surgically exposed, and 2.10⁶ cells were injected in several sites throughout the muscle.

We transplanted with cells the left and right EDL of female mice aged 2 months. We performed three groups of animals: 1) mdx mice transplanted with 10J MPCs (*mdxT10J*), 2) mdx mice transplanted with mdx MPCs (*mdxTmdx*) and 3) 10J mice transplanted with 10J MPCs (*10JT10J*). To study the effect MPCs transplantation on mdx mice, the group of *mdxTmdx* was compared with non-transplanted mice (*mdx*).

2.3.4 Immunosuppression

The host mice were immunosuppressed with 2.5 mg/kg/day i.p. of FK506 until the end of the experiment. The immunosuppression was used to avoid allogenic MPC rejection in the

mdxT10J group, but was also done in the other two groups (syngenic transplantation) to exclude an effect of FK506 in the strength measurements.

2.3.5 Muscle contractile properties

2.3.5.1 Muscle preparation

Mice were anesthetized i.p. with Buprenorphine (0.1 mg/kg) and Pentobarbital (30 mg /kg). The EDL was prepared as described previously (Liu et al. 2005; Warren, Lowe, and Armstrong 1999). Briefly, the EDL was carefully dissected and placed in an organ bath maintained at 30°C. The muscle was incubated with oxygenated Kreps-Ringer's solution (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 24.7 mM NaHCO₃, 2 mM MgSO₄, 1.75 mM NaH₂PO₄, and 2g/l dextrose, pH 7.4).

The proximal tendon was fixed in a stationary clamp with a 3-0 suture (Harvard Apparatus, St. Laurent, Canada). The distal tendon was connected to a dual-mode level arm system 305B-LR (Aurora Scientific, Inc., Aurora, ON, Canada) that provided control of force and positioning of the motor arm so that both dynamic and isometric muscle contractions could be elicited; the stimulations were delivered by a pair of platinum electrodes in either side of the muscle. The force generated by the muscle was controlled by the LabView-based DMC program (Dynamic Muscle Control and Data Acquisition; Aurora Scientific, Inc.). Length and force data were analyzed by the LabView-based DMA program (Dynamic Muscle Data Analysis; Aurora Scientific, Inc.).

2.3.5.2 Isometric contraction protocol

Once dissected and placed in the bath, the muscle was initially set at a resting tension of 1 g for 10 min. L_0 was determined as the muscle length at which the maximal twitch force was elicited. After a 3-min rest, the muscle was subjected to a series of three isometric tetanic stimulations at 150 Hz, each for 500 ms with a 1-min rest between stimulations.

After another 5-min rest, the muscle was subjected to a force–frequency measurement protocol. Briefly, the muscle was stimulated for 500 ms at 80, 120, and 150 Hz, respectively, with 1-min rest between each stimulation. The optimal fiber length (L_f) was determined by multiplying L_o by an L_f/L_o ratio of 0.44. The maximal force response at each stimulation frequency was normalized to muscle cross sectional area (CSA (KN/m²) = (muscle mass, in g)/ [(optimal fiber length, in cm) × (muscle density, in g/cm³)].

2.3.5.3 Eccentric contraction protocol

Before beginning the eccentric contraction protocol, the muscle was rested 10 min. Briefly, the muscle was stimulated at 150 Hz for 700 ms. After 500 ms stimulation, the muscle was lengthened to 110% L_o at 0.5 L_o/s for 200 ms (Fig.8, A). When stimulation ended, the muscle length was reset to L_o at the same rate. This stimulation–stretch cycle was repeated every 2 min for a total of 7 cycles. To determine the percentage of the force drop after each contraction, we considered as 100%, the maximal isometric tetanic force developed during the first 500 ms of the first stimulation. We used the formula $(F_1 - F_n)/F_1$ to calculate the percentage of tetanic force loss at each cycle; F_1 was the tetanic force developed during the first cycle and F_n represented the tetanic force obtained during the n th cycle.

2.3.6 Histological Studies

After the contraction protocol, the muscles were frozen in liquid nitrogen then stored at -80°C. Transverse serial cryostat sections throughout the muscles were collected successively on slides.

The presence of dystrophin in the muscle sections was detected with a rabbit polyclonal antibody directed against the dystrophin C-terminal region. The secondary antibody was an anti-rabbit antibody coupled to red ALEXA 546.

2.4 Results

2.4.1 Presence of dystrophin positive fibers

Few dystrophin positive fibers (approximately 6 per muscle) were observed in the EDL of *mdxTmdx* group; these being likely “revertant fibers” (11). In the *mdxT10J* group a range of 33.19- 42.3% of the muscle fibers were dystrophin positive, with a mean of $37.1 \pm 3.78\%$. These dystrophin positive muscle fibers were formed by the fusion of the donor MPCs with the notexin damaged host muscle fibers (fig. 9A).

2.4.2 Transplantation of mdx MPCs has an effect on mdx EDL total and specific forces

To test whether MPC transplantation has an effect on EDL contractile properties, we transplanted MPCs in the EDL of mdx mice ($N=4$). EDL contractile properties were studied 2 months later, and compared with non-transplanted EDL from mdx mice ($N=4$) at the same age and in the same conditions. The total and specific muscle force in non-transplanted mice was significantly greater only at 80 Hz. At 120 and 150 Hz, there was a trend but not a significant difference (fig. 7). There was also no difference between the masses of the two groups (Table 1). Thus, MPC transplantation, without dystrophin expression, decreased the total and specific forces of the muscle without changing its mass.

2.4.3 Transplantation of mdx MPCs increases muscle resistance to eccentric contractions

Based on the previous results, we hypothesized that since the transplantation of mdx MPCs decreased the muscle total force, it could also increase myofiber susceptibility to eccentric contractions. To verify this hypothesis, the EDL muscles from transplanted and non-transplanted mdx mice were submitted to an eccentric contraction protocol. The EDL was stimulated at 150 Hz for 700 ms; during the last 200 ms of stimulation, the EDL muscle was stretched from its optimal length (L_0) to 110% of L_0 . A total of 7 repeated cycles were applied to each EDL (fig.8A). Eccentric contraction occurs when a muscle is contracting

and lengthened simultaneously. Such forced lengthening damages the myofibers and reduces subsequent tetanic force development.

Curiously, MPC transplantation induced an increase of muscle resistance even if it did not restore dystrophin expression in the myofibers. In fact, in all eccentric contractions, there was a significant difference between the *mdxTmdx* and non-transplanted groups ($P < 0.003$) (fig. 8B).

2.4.4 Dystrophin expression does not increase significantly EDL total and specific force of mdx mice

To test whether dystrophin expression induced by the transplantation of normal MPCs in an mdx muscle could change the muscle response to isometric contractions, the force–frequency relationship was examined in the three transplanted groups of mice (*mdxTmdx*, *mdxT10J* and *10JT10J*).

The study of total force showed that at 80Hz, there was no significant difference between the three groups. At 120 and 150 Hz, there was a significant difference between the groups of *mdxTmdx* and *10JT10J* groups ($P < 0.04$). There was no significant difference between the *mdxT10J* group compared to the two others (Fig. 9B).

When the total force is correlated to the CSA, the specific force in the *10JT10J* group is significantly higher than the two others in all the stimulation frequencies ($P < 0.02$). However, the *mdxT10J* group did not show a significant difference compared with the *mdxTmdx* group even if there seems to be a tendency toward an increase (Fig. 9C).

There was no significant difference in the muscle mass between the *mdxTmdx* and *mdxT10J* groups (Table 1). Thus, dystrophin restoration in $37.1 \pm 3.78\%$ of the muscle myofibers of mdx mice was not sufficient to induce a significant increase in muscle total and specific forces, and did not induce an increase of muscle mass in mdx EDL.

2.4.5 Dystrophin expression results in better protection of EDL against eccentric contraction in mdx mice

The transplantation of mdx MPCs in mdx muscles was sufficient to increase the resistance of the mdx muscle to eccentric contraction (Fig 8B). Can the expression of dystrophin in the mdx muscle further increase the resistance of the mdx muscle? To verify this possibility, we compared the response of EDL to eccentric contractions in the three groups: *mdxTmdx*, *mdxT10J* and *10JT10J*. During the eccentric contractions, there was a significant difference between *mdxTmdx* and *10JT10J* groups. The variance was higher in the *mdxT10J* group than in the other two groups. However, this group was more resistant to eccentric contraction than the *mdxTmdx* group; this difference was seen from the third contraction and reached a significant level at the seventh contraction (fig10. B) ($P < 0.02$).

However, no correlation was observed in the group of *mdxT10J* between the percentage of dystrophin-positive myofibers and the susceptibility of the muscle to eccentric contractions ($R^2 = 0.006$).

To elicit the effect of normal MPC transplantation in mdx mice, we compared the non-transplanted mdx and the *mdxT10J* groups (figure. 10D), the MPC transplantation increased clearly mdx muscle resistance to eccentric contractions ($P < 0.007$ in all contractions).

2.5 Discussion

The most accepted physiological role attributed to dystrophin is to provide mechanical reinforcement of the sarcolemma during myofibers contraction. Lack of dystrophin in DMD patients may induce a fragility of myofibers leading to a progressive degenerative process. Mdx mice are used as a model of DMD and knowledge of the contractile properties of dystrophin deficient muscles is largely derived from experimentation on the mdx EDL muscle (Moens, Baatsen, and Marechal 1993). Many groups have studied different potential therapies in mdx mice. Despite the different therapeutic approaches

investigated, or the protocols to study muscle force or muscle damage, the same result seems to be obtained, i.e., dystrophin restoration in mdx muscles protects them from damage induced by stress (Brussee et al. 1998; Liu et al. 2005; Warren, Lowe, and Armstrong 1999). However, few studies have however focused on the effect of MPC transplantation contraction properties of muscles.

In this study, we analyzed the effect of MPC transplantation and of dystrophin expression in the EDL of mdx mice. First, we studied the effect of MPC transplantation on the contractile properties of mdx EDL. We found that the transplantation of mdx MPCs induced a modest decrease in total and specific forces of the muscle (fig.7). This finding is in accordance with other studies; Irintchev et al, studied the functional and structural recovery of mdx soleus after damage, and observed that the recovery of dystrophic muscles is less efficient than those of normal mice, suggesting an exhaustion of the regenerative capacity in mdx muscles caused by previous cycles of degeneration and regeneration (Irintchev, Zweyer, and Wernig 1997). The decrease of total and specific forces in mdx mice in our study can be explained by an inefficient regeneration after the extensive damage caused by notexin and the numerous MPCs-injections.

We curiously found that mdx MPC transplantation, which does not lead to dystrophin expression, increased nevertheless the resistance of the mdx EDL to eccentric contraction (fig. 8). We attributed this effect to the presence of a thickening of fibrous tissue around the transplanted muscle; which is induced by the chirurgical procedure. Indeed to transplant MPCs in the EDL, we had to lift off the Tibialis anterior muscle which is over the EDL muscle. This damaged the connective tissue which is between the tow muscles and the repair of that tissue increased its thickness. The Trichrome of Masson staining showed collagen fibbers deposition around the transplanted muscles compared with non-transplanted ones (figure 11). The presence of fibrous tissue around the muscle could increase its resistance to stretching during the eccentric contractions.

To study the effect of dystrophin restoration on contraction properties of EDL following the transplantation of normal MPCs in mdx mice, it was important to exclude the effects of the

transplantation itself. We thus compared three groups of transplanted muscles: 1) mdx mice transplanted with 10J MPCs (*mdxT10J*), 2) mdx mice transplanted with mdx MPCs (*mdxTmdx*) and 3) 10J mice transplanted with 10J MPCs (*10JT10J*). In the *mdxT10J* group, there was $37.1 \pm 3.7\%$ of the myofibers expressing dystrophin. This partial restoration of dystrophin in mdx EDL did not significantly increase the total and specific force, although a tendency in this sense was observed, since there was no significant difference between the *mdxT10J* and *10JT10J* groups. The *mdxT10J* group was between the two others (fig. 9). This result indicates that the restoration of the expression of dystrophin in 37% of the myofibers is not sufficient to increase significantly the strength of mdx mouse muscle.

Furthermore, the comparison of the total force of *mdxTmdx* and *10JT10J* groups showed that, the total force of *10JT10J* group is significantly greater than the group of *mdxTmdx*, even if the mass of *mdxTmdx* group was greater. Many groups reported that mdx muscles masses are higher than normal mice; thus the total force of mdx muscles was also consistently greater. When values of total force were normalized by CSA, specific force shows significant weakness for mdx muscles compared with normal mice (Dellorusso et al. 2001). Our results seem opposing, but they confirm the fact that the regenerative capacity of mdx muscles shows a pronounced exhaustion, since after the damage induced by notexin and the several MPCs injections, mdx muscles are not capable to produce higher total force than normal muscles even if their masses are greater.

Other authors demonstrated that dystrophin-deficient mdx muscle fibers were preferentially vulnerable to experimental damage and that the restoration of the dystrophin in the mdx muscle can increase its resistance to exercise (Brussee et al. 1998; Liu et al. 2005; Warren, Lowe, and Armstrong 1999). Our results confirm these findings; since that we observed that the restoration of dystrophin expression in roughly 37 % of the myofibers of mdx EDL gave it a protection from contraction-induced injury (fig. 10).

Furthermore, the comparison of non-transplanted mdx and *mdxT10J* groups showed clearly that the consequence of MPC transplantation is a better protection from damage induced by eccentric contractions, and more importantly that this effect could not be explained only by

the expression of dystrophin in the mdx muscle, but also to the effect of the transplantation itself.

As a conclusion, MPC transplantation in mdx muscles not only induced the expression of dystrophin, but in addition improved some of its contraction properties. In our case, the expression of dystrophin in roughly 37 % of the muscle did not induce a significant increase in muscle force. However, it induced an increase in muscle resistance to eccentric contractions.

2.6 Figures Legends

Figure 7

Figure 7: Transplantation of mdx MPCs has an effect on mdx EDL total and specific forces: the EDL from *mdxTmdx* were compared to non-transplanted EDL. (A) Total and (B) specific force–frequency relationship; open bar, non-transplanted mdx muscles; filled bar, *mdxTmdx*. * Indicates significant difference between the two groups in the stimulation frequency of 80 Hz in total and specific force ($P < 0.03$).

Figure 8

Figure 8: MPC transplantation can increase muscle resistance to eccentric contractions. (A) Schematic representation of the eccentric contraction protocol. Before the contraction, muscle length adjusted at L_0 . The stimulation of the muscle began at 200 ms; the muscle was stimulated at 150Hz for 700ms. After 500 ms stimulation, muscle was stretched at the speed of 50% L_0/s , to 110% of L_0 . At the end of the stimulation, muscle length was returned to L_0 at the same speed. For each EDL, a total of seven eccentric contractions were performed. The change of titanic force between each contraction reflects the degree of muscle damage.

(B) EDL eccentric contraction protocol was performed in *mdxTmdx* group and compared to non-transplanted EDL. The tetanic tension developed during the first cycle was designated as 100%. *Indicates that the force deficit after eccentric contractions was significantly bigger in non-transplanted EDL ($P < 0.003$, in all contractions).

Figure 9

Figure 9: Dystrophin expression does not increase significantly mdx EDL total and specific force. The force–frequency relationship of *mdxTmdx*, *mdxT10J* and *10JT10J* groups was compared. (A) Representative immunofluorescence showing dystrophin positives

myofibers in the *mdxT10J* EDL. (B) Total force measurement after stimulations of 80, 120 and 150 Hz. * Indicates a significant difference in the total force in the group of *10JT10J* compared with the group of *mdxTmdx* only in 120 and 150 Hz ($P<0.03$). (C) Maximal force response at each stimulation frequency was normalized to muscle CSA. * Indicates a significant difference in the group of *10JT10J* compared with the two other groups, in the stimulation frequencies of 80, 120 and 150Hz ($P<0.02$). The difference in total and specific force between the group of *mdxT10J* and the two other groups is not significant.

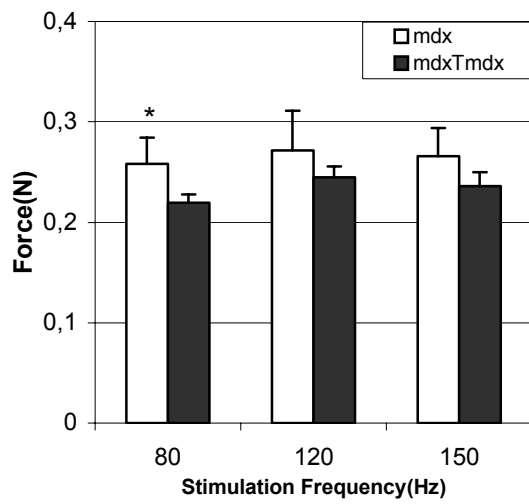
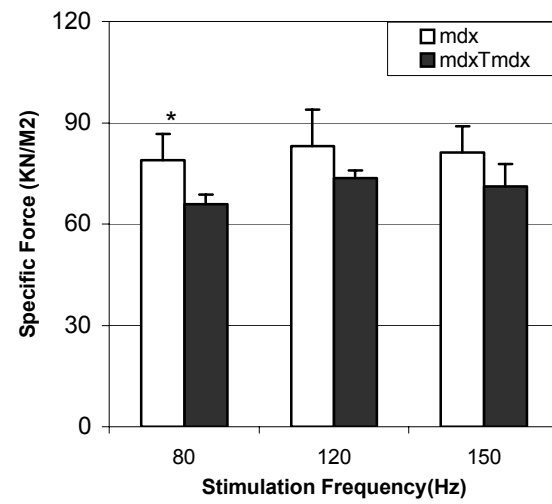
Figure 10

Figure 10: Dystrophin expression results in better protection of EDL against eccentric contraction in *mdx* mice. (A) Relative change in tetanic force during 7 cycles of eccentric contraction in transplanted EDL muscles. * Indicates that the difference between the three studied groups is significant only in the seventh contraction ($P<0.02$). (B) Representation of the % of force drop in the contractions 2, 6 and 7 in the three groups. * Indicates that the *mdxT10J* group (gray bars) showed a significant difference compared with the two other groups only in the seventh contraction. (C) Representation of force tracing in transplanted EDL muscles. Black line represents force tracing in the first cycle; green line, force tracing from the sixth cycle and red line, force tracing from the seventh cycle. (D) The comparison between the *mdxT10J* group and the non-transplanted group. *Indicates that the group of *mdxT10J* group is significantly different from the non-transplanted group ($P<0.007$).

Figure 11

Figure 11: Effect of myoblast transplantation on muscle structure. The non-transplanted (A) and transplanted (B) muscles were stained with the Trichrome de Masson, which stains the muscle fibers in red and collagen in blue.

2.7 Figures

A**B****Figure. 7**

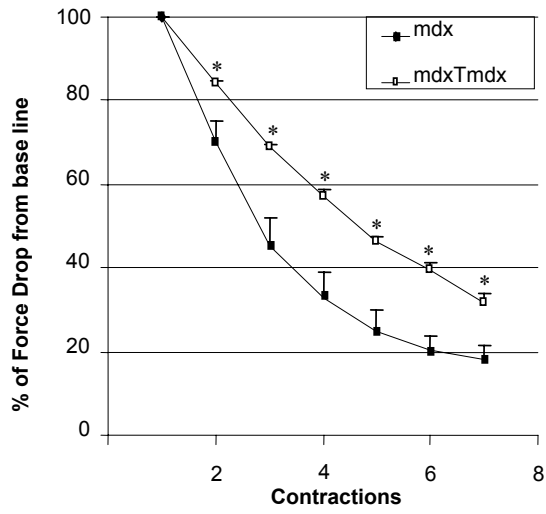
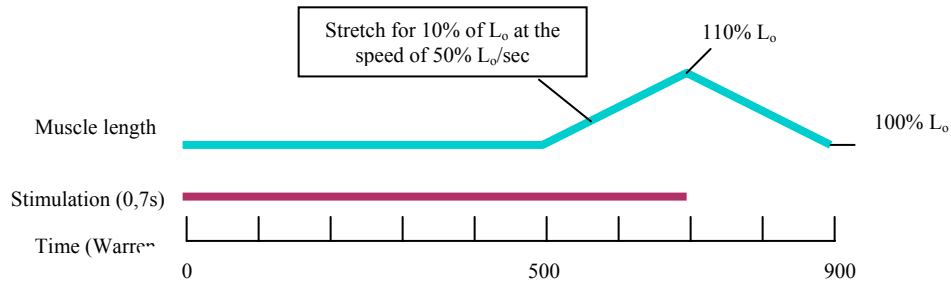
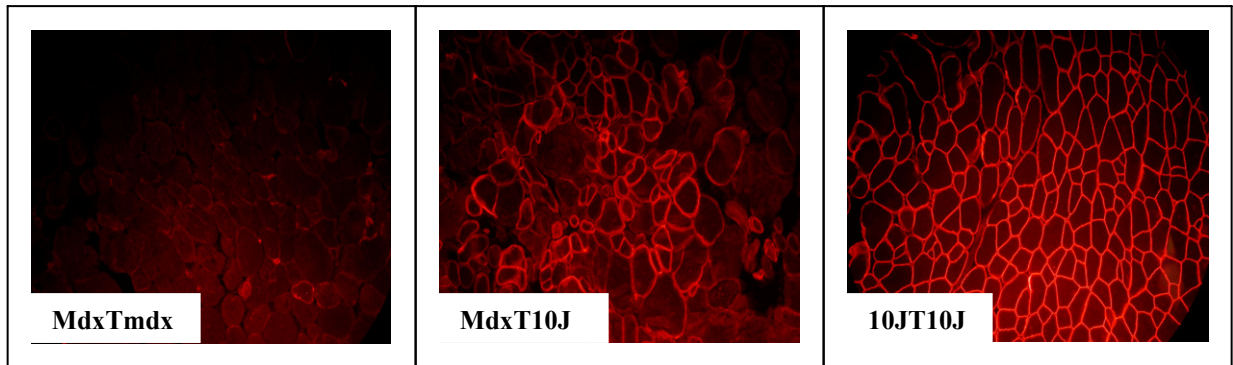
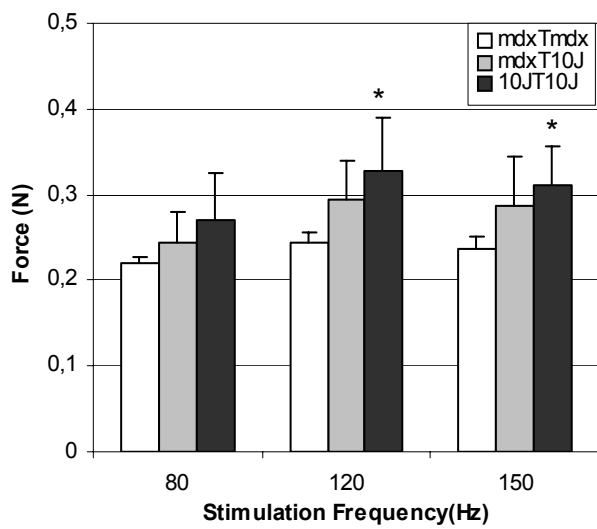


Figure. 8

A



E



C

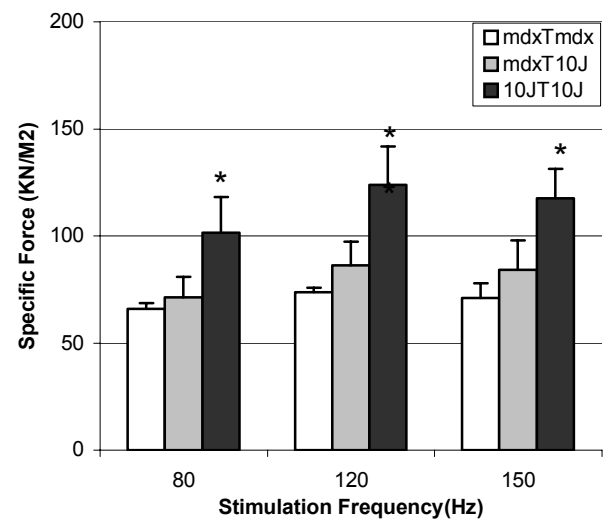
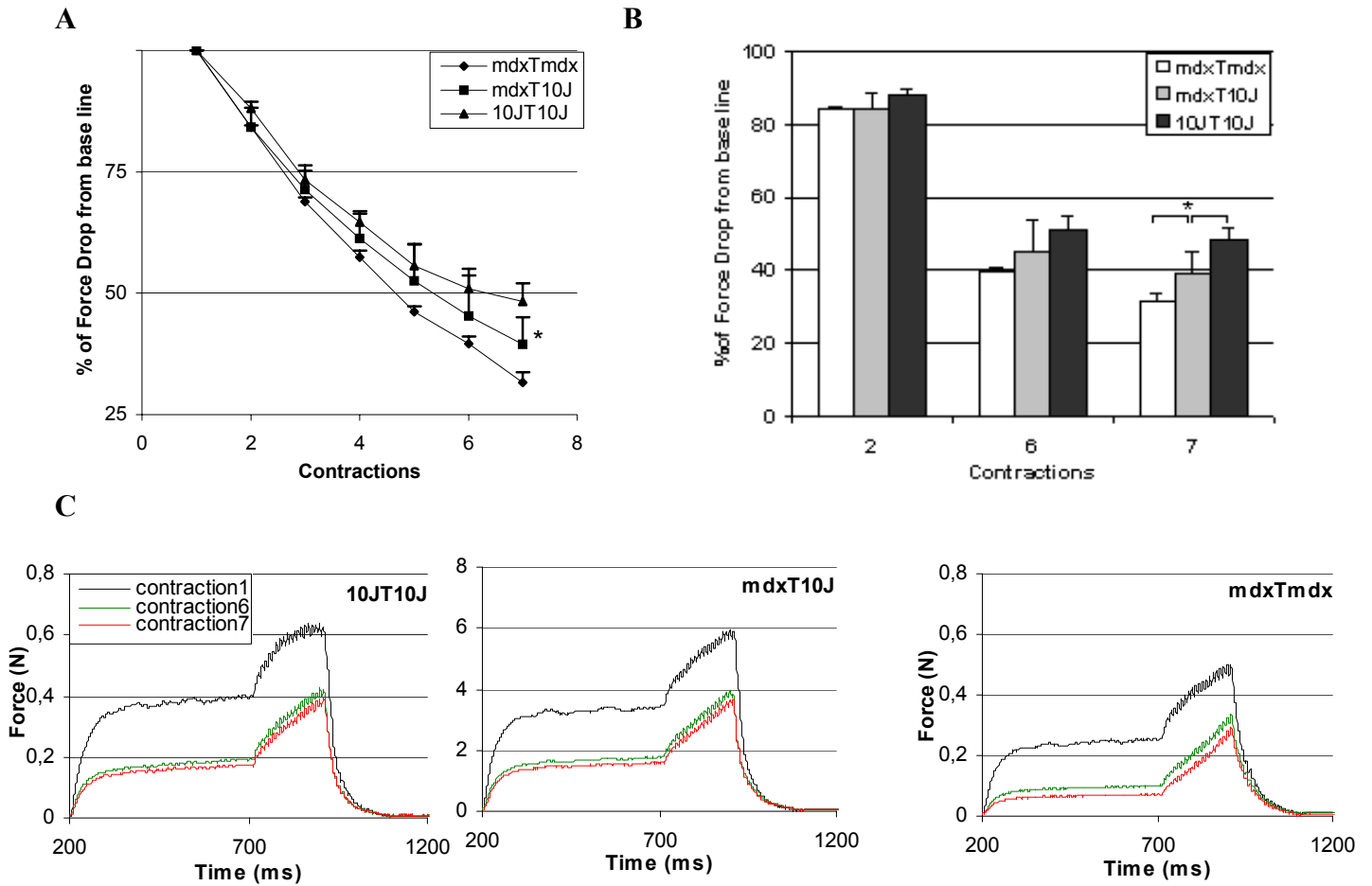
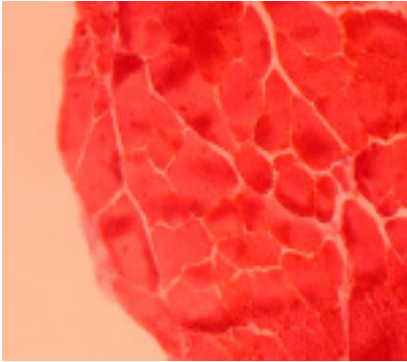


Figure. 9

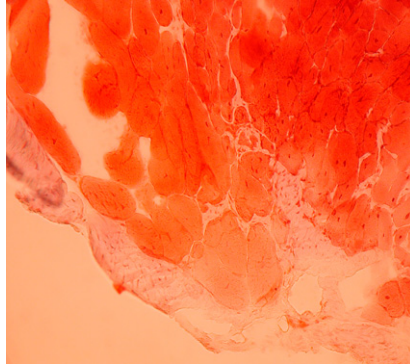
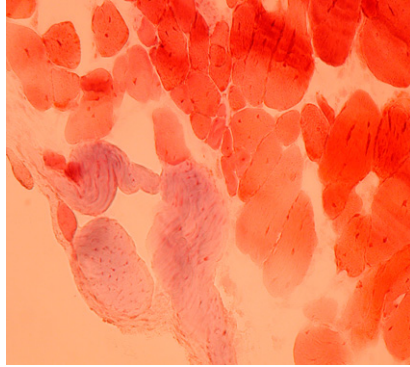


A



Non-transplanted
muscle

B



Transplanted
muscles

Figure. 11

2.8 Tables

Groups	<i>N</i> _a	Age at transplantation (months)	Age at harvest (months)	Weight (mg)	CSA (mm ²) _b
<i>Non-Tmdx</i>	4	N/A _c	4	15.25 ± 0.5	3.27 ± 0.11
<i>MdxTmdx</i>	4	2	4	15.88 ± 0.39	3.3 ± 0.17
<i>MdxT10J</i>	5	2	4	15.08 ± 0.48	3.4 ± 0.15
<i>10JT10J</i>	4	2	4	11.38 ± 0.97	2.6 ± 0.28

Table.1: Characteristics of mice and transplanted EDL muscles:

a The left and right EDL were transplanted; *mdxTmdx*: mdx EDL transplanted with mdx myoblasts; *mdxT10J*:mdx EDL transplanted with 10J myoblasts and *10JT10J*: 10J EDL transplanted with 10J myoblasts. Non-Tmdx: non transplanted mdx.

b Cross-sectional area.

c Not applicable.

Conclusion

La dystrophie musculaire de Duchenne est une maladie héréditaire grave, et comme pratiquement toutes les maladies héréditaires, il n'existe pas de traitement curatif, les seuls traitements disponibles actuellement sont symptomatiques et ne permettent pas de traiter la maladie. L'absence de la dystrophine résulte en une faiblesse musculaire progressive aboutissant à une insuffisance cardiaque et respiratoire, ce qui cause la mort des malades dans la vingtaine. La transplantation de myoblastes est l'un des traitements expérimentaux proposés, le but du traitement est de transplanter des myoblastes normaux dans un muscle dystrophique pour créer de nouvelles fibres hybrides qui expriment la dystrophine.

Le traitement de la maladie de Duchenne par la transplantation de myoblastes constitue l'une des thérapies expérimentales les moins agressives pour le moment. Cependant, la transplantation de cellules dans les muscles cardiaque et respiratoires reste impossible avec les moyens actuels. Le traitement par la transplantation de myoblastes a pour but d'améliorer la qualité de vie des patients et de leur permettre une meilleure autonomie ; les complications cardiaques et pulmonaires restent pour l'instant inévitables. L'association de la thérapie par transplantation de myoblastes à une autre approche comme la thérapie génique ou la transplantation des cellules souches permettra probablement un jour de traiter les muscles respiratoires et cardiaque et de prolonger ainsi la vie des malades.

La transplantation des myoblastes est applicable pour d'autres maladies impliquant les muscles, comme la transplantation du sphincter vésical dans l'incontinence urinaire, qui est une pathologie fréquente chez l'homme suite à une chirurgie pour des maladies prostatiques. Elle a été appliquée également pour le traitement de l'infarctus du myocarde, en effet l'injection de myoblastes dans les zones nécrotiques du cœur permettrait de rétablir sa contractilité et diminue par conséquent les risques d'insuffisance cardiaque, ce traitement permet de prévenir du moins à court terme (6 mois) la progression de l'insuffisance cardiaque.

Bien que cette thérapie a prouvé son efficacité pour le rétablissement de l'expression de la dystrophine aussi bien chez les animaux dystrophiques que chez les humains, aucune étude physiologique n'a été faite sur les muscles greffés pour démontrer que la transplantation de myoblastes peut changer leurs propriétés contractiles. A ce stade de la recherche sur la transplantation de myoblastes, l'étude de la contractilité des muscles greffés est une étape nécessaire pour prouver l'efficacité de la thérapie.

Ce travail apporte des données importantes et met en évidence les effets de la thérapeutique sur la physiologie des muscles greffés, et prouve que la transplantation de myoblastes constitue un véritable espoir pour pouvoir un jour traiter les malades et leur permettre une meilleure qualité de vie, en améliorant la résistance musculaire.

Bibliographie

- Allbrook, D. 1981. Skeletal muscle regeneration. *Muscle Nerve* 4 (3):234-45.
- Barnea, E., D. Zuk, R. Simantov, U. Nudel, and D. Yaffe. 1990. Specificity of expression of the muscle and brain dystrophin gene promoters in muscle and brain cells. *Neuron* 5 (6):881-8.
- Barohn, R. J., E. J. Levine, J. O. Olson, and J. R. Mendell. 1988. Gastric hypomotility in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 319 (1):15-8.
- Bieber, F. R., and E. P. Hoffman. 1990. Duchenne and Becker muscular dystrophies: genetics, prenatal diagnosis, and future prospects. *Clin Perinatol* 17 (4):845-65.
- Biggar, W. D., H. J. Klamut, P. C. Demacio, D. J. Stevens, and P. N. Ray. 2002. Duchenne muscular dystrophy: current knowledge, treatment, and future prospects. *Clin Orthop Relat Res* (401):88-106.
- Bischoff, R., and C. Heintz. 1994. Enhancement of skeletal muscle regeneration. *Dev Dyn* 201 (1):41-54.
- Bonilla, E., C. E. Samitt, A. F. Miranda, A. P. Hays, G. Salviati, S. DiMauro, L. M. Kunkel, E. P. Hoffman, and L. P. Rowland. 1988. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell* 54 (4):447-52.
- Bouchentouf, M., B. F. Benabdallah, and J. P. Tremblay. 2004. Myoblast survival enhancement and transplantation success improvement by heat-shock treatment in mdx mice. *Transplantation* 77 (9):1349-56.
- Brussee, V., F. Merly, F. Tardif, and J. P. Tremblay. 1998. Normal myoblast implantation in MDX mice prevents muscle damage by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 250 (2):321-7.
- Brussee, V., F. Tardif, and J. P. Tremblay. 1997. Muscle fibers of mdx mice are more vulnerable to exercise than those of normal mice. *Neuromuscul Disord* 7 (8):487-92.
- Bulfield, G., W. G. Siller, P. A. Wight, and K. J. Moore. 1984. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (4):1189-92.
- Bushby, K. M., A. Hill, and J. G. Steele. 1999. Failure of early diagnosis in symptomatic Duchenne muscular dystrophy. *Lancet* 353 (9152):557-8.
- Camirand, G., J. Rousseau, M. E. Ducharme, D. M. Rothstein, and J. P. Tremblay. 2004. Novel Duchenne muscular dystrophy treatment through myoblast transplantation tolerance with anti-CD45RB, anti-CD154 and mixed chimerism. *Am J Transplant* 4 (8):1255-65.
- Caskey, C. T., R. L. Nussbaum, L. C. Cohan, and L. Pollack. 1980. Sporadic occurrence of Duchenne muscular dystrophy: evidence for new mutation. *Clin Genet* 18 (5):329-41.
- Chen, M., H. J. Li, Q. Fang, T. G. Goodwin, J. A. Florendo, and P. K. Law. 1992. Dystrophin cytochemistry in mdx mouse muscles injected with labeled normal myoblasts. *Cell Transplant* 1 (1):17-22.
- Conboy, I. M., and T. A. Rando. 2005. Aging, stem cells and tissue regeneration: lessons from muscle. *Cell Cycle* 4 (3):407-10.
- Dellorusso, C., R. W. Crawford, J. S. Chamberlain, and S. V. Brooks. 2001. Tibialis anterior muscles in mdx mice are highly susceptible to contraction-induced injury. *J Muscle Res Cell Motil* 22 (5):467-75.

- Duchenne, G. B. 1968. Studies on pseudohypertrophic muscular paralysis or myosclerotic paralysis. *Arch Neurol* 19 (6):629-36.
- Eagle, M., S. V. Baudouin, C. Chandler, D. R. Giddings, R. Bullock, and K. Bushby. 2002. Survival in Duchenne muscular dystrophy: improvements in life expectancy since 1967 and the impact of home nocturnal ventilation. *Neuromuscul Disord* 12 (10):926-9.
- El Fahime, E., P. Mills, J. F. Lafreniere, Y. Torrente, and J. P. Tremblay. 2002. The urokinase plasminogen activator: an interesting way to improve myoblast migration following their transplantation. *Exp Cell Res* 280 (2):169-78.
- Fassati, A., and N. Bresolin. 2000. Retroviral vectors for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Neurol Sci* 21 (5 Suppl):S925-7.
- Grounds, M. D. 1991. Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Pathol Res Pract* 187 (1):1-22.
- . 1996. Commentary on the present state of knowledge for myoblast transfer therapy. *Cell Transplant* 5 (3):431-3.
- Guerette, B., K. Wood, R. Roy, and J. P. Tremblay. 1997. Efficient myoblast transplantation in mice immunosuppressed with monoclonal antibodies and CTLA4 Ig. *Transplant Proc* 29 (4):1932-4.
- Gussoni, E., R. R. Bennett, K. R. Muskiewicz, T. Meyerrose, J. A. Nolte, I. Gilgoff, J. Stein, Y. M. Chan, H. G. Lidov, C. G. Bonnemann, A. Von Moers, G. E. Morris, J. T. Den Dunnen, J. S. Chamberlain, L. M. Kunkel, and K. Weinberg. 2002. Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 110 (6):807-14.
- Gussoni, E., G. K. Pavlath, A. M. Lanctot, K. R. Sharma, R. G. Miller, L. Steinman, and H. M. Blau. 1992. Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature* 356 (6368):435-8.
- Gussoni, E., Y. Soneoka, C. D. Strickland, E. A. Buzney, M. K. Khan, A. F. Flint, L. M. Kunkel, and R. C. Mulligan. 1999. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401 (6751):390-4.
- Hoffman, E. P., R. H. Brown, Jr., and L. M. Kunkel. 1987. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51 (6):919-28.
- Hoffman, E. P., M. S. Hudecki, P. A. Rosenberg, C. M. Pollina, and L. M. Kunkel. 1988. Cell and fiber-type distribution of dystrophin. *Neuron* 1 (5):411-20.
- Huard, J., J. P. Bouchard, R. Roy, C. Labrecque, G. Dansereau, B. Lemieux, and J. P. Tremblay. 1991. Myoblast transplantation produced dystrophin-positive muscle fibres in a 16-year-old patient with Duchenne muscular dystrophy. *Clin Sci (Lond)* 81 (2):287-8.
- Huard, J., J. P. Bouchard, R. Roy, F. Malouin, G. Dansereau, C. Labrecque, N. Albert, C. L. Richards, B. Lemieux, and J. P. Tremblay. 1992. Human myoblast transplantation: preliminary results of 4 cases. *Muscle Nerve* 15 (5):550-60.
- Huard, J., B. Cao, and Z. Qu-Petersen. 2003. Muscle-derived stem cells: potential for muscle regeneration. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69 (3):230-7.
- Huard, J., G. Tremblay, S. Verreault, C. Labrecque, and J. P. Tremblay. 1993. Utilization of an antibody specific for human dystrophin to follow myoblast transplantation in nude mice. *Cell Transplant* 2 (2):113-8.
- Irintchev, A., M. Zwyer, and A. Wernig. 1997. Impaired functional and structural recovery after muscle injury in dystrophic mdx mice. *Neuromuscul Disord* 7 (2):117-25.

- Ito, H., P. L. Hallauer, K. E. Hastings, and J. P. Tremblay. 1998. Prior culture with concanavalin A increases intramuscular migration of transplanted myoblast. *Muscle Nerve* 21 (3):291-7.
- Jackson, K. A., T. Mi, and M. A. Goodell. 1999. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (25):14482-6.
- Kami, K., and E. Senba. 1998. Localization of leukemia inhibitory factor and interleukin-6 messenger ribonucleic acids in regenerating rat skeletal muscle. *Muscle Nerve* 21 (6):819-22.
- Karpati, G., D. Ajdukovic, D. Arnold, R. B. Gledhill, R. Guttmann, P. Holland, P. A. Koch, E. Shoubridge, D. Spence, M. Vanasse, and et al. 1993. Myoblast transfer in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 34 (1):8-17.
- Kinoshita, I., R. Roy, F. J. Dugre, C. Gravel, B. Roy, M. Goulet, I. Asselin, and J. P. Tremblay. 1996. Myoblast transplantation in monkeys: control of immune response by FK506. *J Neuropathol Exp Neurol* 55 (6):687-97.
- Kinoshita, I., J. T. Vilquin, B. Guerette, I. Asselin, R. Roy, S. Lille, and J. P. Tremblay. 1994. Immunosuppression with FK 506 insures good success of myoblast transplantation in MDX mice. *Transplant Proc* 26 (6):3518.
- Koenig, M., E. P. Hoffman, C. J. Bertelson, A. P. Monaco, C. Feener, and L. M. Kunkel. 1987. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50 (3):509-17.
- Kunkel, L. M., A. H. Beggs, and E. P. Hoffman. 1989. Molecular genetics of Duchenne and Becker muscular dystrophy: emphasis on improved diagnosis. *Clin Chem* 35 (7 Suppl):B21-4.
- Kunkel, L. M., A. P. Monaco, E. Hoffman, M. Koenig, C. Feener, and C. Bertelson. 1987. Molecular studies of progressive muscular dystrophy (Duchenne). *Enzyme* 38 (1-4):72-5.
- Lafreniere, J. F., P. Mills, J. P. Tremblay, and E. El Fahime. 2004. Growth factors improve the in vivo migration of human skeletal myoblasts by modulating their endogenous proteolytic activity. *Transplantation* 77 (11):1741-7.
- Lamb, G. D. 2002. Excitation-contraction coupling and fatigue mechanisms in skeletal muscle: studies with mechanically skinned fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 23 (1):81-91.
- Lapidos, K. A., R. Kakkar, and E. M. McNally. 2004. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res* 94 (8):1023-31.
- Law, P. K., T. E. Bertorini, T. G. Goodwin, M. Chen, Q. W. Fang, H. J. Li, D. S. Kirby, J. A. Florendo, H. G. Herrod, and G. S. Golden. 1990. Dystrophin production induced by myoblast transfer therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet* 336 (8707):114-5.
- Law, P. K., T. G. Goodwin, Q. Fang, M. B. Deering, V. Duggirala, C. Larkin, J. A. Florendo, D. S. Kirby, H. J. Li, M. Chen, and et al. 1993. Cell transplantation as an experimental treatment for Duchenne muscular dystrophy. *Cell Transplant* 2 (6):485-505.
- Lee-Pullen, T. F., A. L. Bennett, M. W. Beilharz, M. D. Grounds, and L. M. Samuels. 2004. Superior survival and proliferation after transplantation of myoblasts

- obtained from adult mice compared with neonatal mice. *Transplantation* 78 (8):1172-6.
- Liu, M., Y. Yue, S. Q. Harper, R. W. Grange, J. S. Chamberlain, and D. Duan. 2005. Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury. *Mol Ther* 11 (2):245-56.
- Lorenzon, P., E. Bandi, F. de Guarrini, T. Pietrangelo, R. Schafer, M. Zweyer, A. Wernig, and F. Ruzzier. 2004. Ageing affects the differentiation potential of human myoblasts. *Exp Gerontol* 39 (10):1545-54.
- Lu, Q. L., C. J. Mann, F. Lou, G. Bou-Gharios, G. E. Morris, S. A. Xue, S. Fletcher, T. A. Partridge, and S. D. Wilton. 2003. Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med* 9 (8):1009-14.
- Maheshwari, M., R. Vijaya, M. Kabra, S. Arora, S. S. Shastri, D. Deka, A. Kriplani, and P. S. Menon. 2000. Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *Natl Med J India* 13 (3):129-31.
- Matsuoka, S., K. Ii, H. Akita, H. Tomimatsu, Y. Kurahashi, T. Nakatsu, and M. Miyao. 1987. Clinical features and cardiopulmonary function of patients with atrophic heart in Duchenne muscular dystrophy. *Jpn Heart J* 28 (5):687-94.
- Mauro, A. 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9:493-5.
- Mehler, M. F. 2000. Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Res Brain Res Rev* 32 (1):277-307.
- Mendell, J. R., J. T. Kissel, A. A. Amato, W. King, L. Signore, T. W. Prior, Z. Sahenk, S. Benson, P. E. McAndrew, R. Rice, and et al. 1995. Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 333 (13):832-8.
- Menke, A., and H. Jockusch. 1991. Decreased osmotic stability of dystrophin-less muscle cells from the mdx mouse. *Nature* 349 (6304):69-71.
- Michele, D. E., and K. P. Campbell. 2003. Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function. *J Biol Chem* 278 (18):15457-60.
- Miller, R. G., K. R. Sharma, G. K. Pavlath, E. Gussoni, M. Mynhier, A. M. Lanctot, C. M. Greco, L. Steinman, and H. M. Blau. 1997. Myoblast implantation in Duchenne muscular dystrophy: the San Francisco study. *Muscle Nerve* 20 (4):469-78.
- Moens, P., P. H. Baatsen, and G. Marechal. 1993. Increased susceptibility of EDL muscles from mdx mice to damage induced by contractions with stretch. *J Muscle Res Cell Motil* 14 (4):446-51.
- Morgan, J. E., E. P. Hoffman, and T. A. Partridge. 1990. Normal myogenic cells from newborn mice restore normal histology to degenerating muscles of the mdx mouse. *J Cell Biol* 111 (6 Pt 1):2437-49.
- Muntoni, F., S. Torelli, and A. Ferlini. 2003. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* 2 (12):731-40.
- Murakami, N., I. S. McLennan, I. Nonaka, K. Koishi, C. Baker, and G. Hammond-Tooke. 1999. Transforming growth factor-beta2 is elevated in skeletal muscle disorders. *Muscle Nerve* 22 (7):889-98.
- Parks, R. J. 2000. Improvements in adenoviral vector technology: overcoming barriers for gene therapy. *Clin Genet* 58 (1):1-11.
- Partridge, T. A. 1991. Invited review: myoblast transfer: a possible therapy for inherited myopathies? *Muscle Nerve* 14 (3):197-212.

- Partridge, T. A., M. Grounds, and J. C. Sloper. 1978. Evidence of fusion between host and donor myoblasts in skeletal muscle grafts. *Nature* 273 (5660):306-8.
- Partridge, T. A., J. E. Morgan, G. R. Coulton, E. P. Hoffman, and L. M. Kunkel. 1989. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature* 337 (6203):176-9.
- Payne, T. R., H. Oshima, T. Sakai, Y. Ling, B. Gharaibeh, J. Cummins, and J. Huard. 2005. Regeneration of dystrophin-expressing myocytes in the mdx heart by skeletal muscle stem cells. *Gene Ther* 12 (16):1264-74.
- Pearce, J. M. 2005. Early observations on duchenne-meryon muscular dystrophy. *Eur Neurol* 54 (1):46-8.
- Petrof, B. J. 2002. Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex. *Am J Phys Med Rehabil* 81 (11 Suppl):S162-74.
- Porreca, E., M. D. Guglielmi, A. Uncini, P. Di Gregorio, A. Angelini, C. Di Febbo, S. D. Pierdomenico, G. Baccante, and F. Cuccurullo. 1999. Haemostatic abnormalities, cardiac involvement and serum tumor necrosis factor levels in X-linked dystrophic patients. *Thromb Haemost* 81 (4):543-6.
- Quenneville, S. P., P. Chapdelaine, J. Rousseau, J. Beaulieu, N. J. Caron, D. Skuk, P. Mills, E. C. Olivares, M. P. Calos, and J. P. Tremblay. 2004. Nucleofection of muscle-derived stem cells and myoblasts with phiC31 integrase: stable expression of a full-length-dystrophin fusion gene by human myoblasts. *Mol Ther* 10 (4):679-87.
- Quenneville, S.P., Chapdelaine, P., Skuk, D., Paradis, M., Goulet, M., Rousseau, J., Xiao, X., Garcia, L. and Tremblay, J.P. Autologous transplantation of muscle precursor cells genetically modified with a lentivirus for muscular dystrophy: human cells and primates models. In press in *Molecular Therapy* (12 Sept 2006).
- Rando, T. A. 2001. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 24 (12):1575-94.
- . 2006. Non-viral gene therapy for Duchenne muscular dystrophy: Progress and challenges. *Biochim Biophys Acta*.
- Schmalbruch, H. 1984. Regenerated muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy: a serial section study. *Neurology* 34 (1):60-5.
- Sciote, J. J., and T. J. Morris. 2000. Skeletal muscle function and fibre types: the relationship between occlusal function and the phenotype of jaw-closing muscles in human. *J Orthod* 27 (1):15-30.
- Scott, J. M., S. Li, S. Q. Harper, R. Welikson, D. Bourque, C. DelloRusso, S. D. Hauschka, and J. S. Chamberlain. 2002. Viral vectors for gene transfer of micro-, mini-, or full-length dystrophin. *Neuromuscul Disord* 12 Suppl 1:S23-9.
- Seale, P., L. A. Sabourin, A. Girgis-Gabardo, A. Mansouri, P. Gruss, and M. A. Rudnicki. 2000. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102 (6):777-86.
- Skuk, D., M. Goulet, B. Roy, P. Chapdelaine, J. P. Bouchard, R. Roy, F. J. Dugre, M. Sylvain, J. G. Lachance, L. Deschenes, H. Senay, and J. P. Tremblay. 2006. Dystrophin expression in muscles of duchenne muscular dystrophy patients after high-density injections of normal myogenic cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 65 (4):371-86.
- Skuk, D., M. Goulet, B. Roy, V. Piette, C. H. Cote, P. Chapdelaine, J. Y. Hogrel, M. Paradis, J. P. Bouchard, M. Sylvain, J. G. Lachance, and J. P. Tremblay. 2006.

- First test of a "high-density injection" protocol for myogenic cell transplantation throughout large volumes of muscles in a Duchenne muscular dystrophy patient: eighteen months follow-up. *Neuromuscul Disord*.
- Skuk, D., M. Goulet, B. Roy, and J. P. Tremblay. 2000. Myoblast transplantation in whole muscle of nonhuman primates. *J Neuropathol Exp Neurol* 59 (3):197-206.
- . 2002. Efficacy of myoblast transplantation in nonhuman primates following simple intramuscular cell injections: toward defining strategies applicable to humans. *Exp Neurol* 175 (1):112-26.
- Skuk, D., and J. P. Tremblay. 1998. Complement deposition and cell death after myoblast transplantation. *Cell Transplant* 7 (5):427-34.
- . 2000. Progress in myoblast transplantation: a potential treatment of dystrophies. *Microsc Res Tech* 48 (3-4):213-22.
- . 2003. Myoblast transplantation: the current status of a potential therapeutic tool for myopathies. *J Muscle Res Cell Motil* 24 (4-6):285-300.
- Sussman, M. 2002. Duchenne muscular dystrophy. *J Am Acad Orthop Surg* 10 (2):138-51.
- Tatsumi, R., J. E. Anderson, C. J. Nevoret, O. Halevy, and R. E. Allen. 1998. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol* 194 (1):114-28.
- Tremblay, J. P., F. Malouin, R. Roy, J. Huard, J. P. Bouchard, A. Satoh, and C. L. Richards. 1993. Results of a triple blind clinical study of myoblast transplantations without immunosuppressive treatment in young boys with Duchenne muscular dystrophy. *Cell Transplant* 2 (2):99-112.
- Tubbs, R. S., and W. J. Oakes. 2004. Urinary incontinence in a patient with Duchenne muscular dystrophy and cord in the normal position with fatty filum terminale. *Childs Nerv Syst* 20 (10):717-9.
- Tyler, K. L. 2003. Origins and early descriptions of "Duchenne muscular dystrophy". *Muscle Nerve* 28 (4):402-22.
- Vilquin, J. T., V. Brussee, I. Asselin, I. Kinoshita, M. Gingras, and J. P. Tremblay. 1998. Evidence of mdx mouse skeletal muscle fragility in vivo by eccentric running exercise. *Muscle Nerve* 21 (5):567-76.
- Vilquin, J. T., I. Kinoshita, R. Roy, and J. P. Tremblay. 1995. Cyclophosphamide immunosuppression does not permit successful myoblast allotransplantation in mouse. *Neuromuscul Disord* 5 (6):511-7.
- Vilquin, J. T., E. Wagner, I. Kinoshita, R. Roy, and J. P. Tremblay. 1995. Successful histocompatible myoblast transplantation in dystrophin-deficient mdx mouse despite the production of antibodies against dystrophin. *J Cell Biol* 131 (4):975-88.
- Wakitani, S., T. Saito, and A. I. Caplan. 1995. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 18 (12):1417-26.
- Wang, B., J. Li, and X. Xiao. 2000. Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (25):13714-9.
- Warren, G. L., D. A. Lowe, and R. B. Armstrong. 1999. Measurement tools used in the study of eccentric contraction-induced injury. *Sports Med* 27 (1):43-59.
- Wernig, A., M. Zweyer, and A. Irintchev. 2000. Function of skeletal muscle tissue formed after myoblast transplantation into irradiated mouse muscles. *J Physiol* 522 Pt 2:333-45.

- Yang, J., M. Seelig, S. Rayner, and D. E. Bredesen. 1992. Increasing the proliferative capacity of muscular dystrophy myoblasts. *Muscle Nerve* 15 (8):941-8.
- Yue, Y., Z. Li, S. Q. Harper, R. L. Davisson, J. S. Chamberlain, and D. Duan. 2003. Microdystrophin gene therapy of cardiomyopathy restores dystrophin-glycoprotein complex and improves sarcolemma integrity in the mdx mouse heart. *Circulation* 108 (13):1626-32.
- Zhang, G., J. J. Ludtke, C. Thioudellet, P. Kleinpeter, M. Antoniou, H. Herweijer, S. Braun, and J. A. Wolff. 2004. Intraarterial delivery of naked plasmid DNA expressing full-length mouse dystrophin in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* 15 (8):770-82.