

## Approche thérapeutique de la myopathie de Duchenne par transplantation de myoblastes

Claude Labrecque  
Jean-Pierre Bouchard  
Francine Malouin  
Raynald Roy  
Johnny Huard  
Jacques P. Tremblay

Les muscles squelettiques contiennent des cellules satellites quiescentes capables d'engendrer des myoblastes fusionnant en myotubes, *in vivo* en cas de régénération secondaire à une atteinte du muscle ou *ex vivo* en culture. Si des myoblastes normaux ainsi cultivés sont injectés dans des muscles de myopathes, des myotubes chimériques apparaissent, contenant à la fois des noyaux porteurs de la mutation et des noyaux normaux qui commandent la synthèse de dystrophine. Plusieurs essais pratiqués à petite échelle chez l'homme ont permis de valider cette approche et d'obtenir des résultats encourageants. Les obstacles qui persistent restent cependant importants ; ils sont de trois ordres : immunologique, le rejet possible nécessitant l'utilisation d'immunosuppresseurs ; d'accessibilité de certains muscles, comme le diaphragme, à des injections qui devraient apporter des dizaines de millions de myoblastes en des centaines de sites ; de nature du muscle cardiaque, enfin, qui ne devrait pas être accessible à un tel traitement.

### ADRESSES

C. Labrecque : stagiaire doctoral. J.-P. Bouchard : directeur du département de neurologie. F. Malouin : professeur au département de physiothérapie. J. Huard : stagiaire doctoral. J.-P. Tremblay : directeur du groupe de recherche sur la transplantation de myoblastes et directeur du département d'anatomie de l'université Laval. Laboratoire de neurobiologie, université Laval et hôpital de l'Enfant-Jésus, 1401, 18<sup>e</sup> Rue, Québec G1J-1Z4, Canada.

R. Roy : responsable du laboratoire d'histocompatibilité. Unité de recherche inflammation et immunologie-rhumatologie, centre hospitalier, université Laval, 2705 boulevard Laurier, Ste-Foy, P.Q., G1V-4G2, Canada.

m/s n° 8, vol. 7, octobre 91

La myopathie de Duchenne (DMD) est une maladie dégénérative du muscle squelettique et cardiaque. Liée au chromosome X, elle est transmise de mère en fils et son incidence est de 1 sur 3 500 naissances de garçons. Dans un tiers des cas où il n'y a aucun antécédent familial connu, la maladie résulterait d'une nouvelle mutation génique. La myopathie de Duchenne se caractérise par une faiblesse musculaire pro-

gressive affectant successivement les muscles proximaux et distaux. On retrouve dans le sérum de ces enfants une élévation anormale de la créatine phosphokinase (CK) imputable à la dégénérescence des fibres musculaires. Le phénotype est apparent dès l'âge de deux ans et la maladie est généralement fatale vers vingt ans. La biologie moléculaire a permis d'identifier le gène muté (région Xp21) dans les myopathies de Duchenne (DMD) et de Becker

(BMD) [1, 2], ainsi que son produit, la dystrophine, une protéine d'un poids moléculaire de 42 000 [3] (figure 1). La dystrophine, qui est présente dans toutes les fibres musculaires normales (figures 2 ci-dessous et 3 p. 824), est presque totalement absente des muscles squelettiques des patients atteints de myopathie de Duchenne [4, 5].

Trois observations suggèrent que la dystrophine joue un rôle dans le maintien de l'intégrité membranaire des fibres musculaires. Premièrement, on a pu déterminer, à partir de l'examen d'une séquence d'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) du messageur ARN, que la dystrophine est une protéine de forme cylindrique [6], distribuée de façon très périodique sous la membrane (période de 125 nm, soit 1/10 du sarcomère) [7]. Une telle répétition de la protéine suggère qu'elle forme un réseau. Selon Campbell et Kahl [8], la dystrophine serait liée à une variété de glycoprotéines associées à la membrane plasmique. Chez les patients atteints de myopa-

thie de Duchenne, où la dystrophine est absente, de fréquentes ruptures de la membrane musculaire sont observées. Watkins *et al.* [7] et Zubrzycka-Gaarn *et al.* [5] ont donc émis l'hypothèse que la dystrophine augmente la résistance de la membrane musculaire à l'étirement.

Suite à l'identification du gène de la myopathie de Duchenne, plusieurs sondes ADNc ont été fabriquées pour diverses régions du gène. Ces sondes servent au dépistage de la ou des délétions responsables de la maladie et au diagnostic prénatal dans les familles à risque [9]. Une autre technique encore plus sensible pour identifier les délétions est l'emploi d'une réaction d'amplification de fragments d'ADN (PCR). Cette technique fait appel à de petits fragments d'ADN qui s'attachent spécifiquement de part et d'autre d'un segment (exon) du gène de la dystrophine. La présence de ces amorces permet à la polymérase d'amplifier des milliers de fois l'exon interposé [10]. Bien que la dimension et la position des délétions dans le gène de la dystrophine soient

variables, celles-ci ont toujours pour conséquence une absence complète de la protéine chez les patients atteints de myopathie de Duchenne [11]. Lorsqu'ils ont observé la présence d'un faible pourcentage de fibres positives pour la dystrophine chez ces patients, Nicholson *et al.* ont attribué ce phénomène à une mutation inverse [12]. Dans la myopathie de Becker, la dystrophine se retrouve dans une proportion plus élevée de fibres musculaires, ce qui pourrait expliquer la plus grande résistance du système musculaire à la dégénérescence.

### Myogenèse et régénération musculaire

Les muscles sont constitués d'un regroupement de fibres musculaires striées et multinucléées, formées durant le développement embryonnaire par la fusion de myoblastes mononucléés. Ces fibres striées sont des structures complexes, hautement différenciées et non mitotiques. En aucun moment leurs noyaux ne synthétisent d'ADN, ni ne se divi-

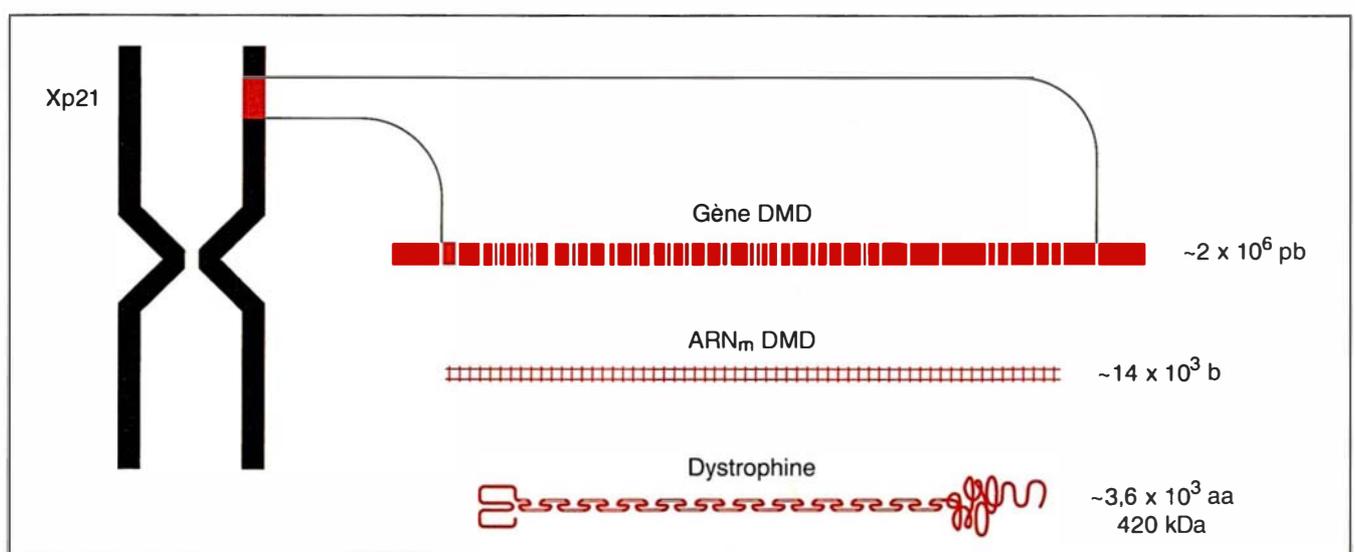


Figure 1. Le gène muté dans la myopathie de Duchenne est situé dans la région Xp21 du chromosome X. Il s'agit d'un gène de  $2 \times 10^6$  paires de bases. Ce gène contient environ 70 exons produisant un ARNm d'environ 14 000 nucléotides. La protéine produite par ce gène contient environ 3 600 acides aminés et aurait une forme de tige.

sent. C'est pourquoi la multinucléation ne peut provenir que de la fusion myoblastique [13, 14]. Un faible pourcentage des myoblastes embryonnaires ne fusionnent pas lors du développement embryonnaire, mais tombent en quiescence, formant ainsi les cellules satellites accolées aux fibres musculaires. Les muscles d'un individu normal contiennent des cellules satellites toute leur vie durant [15]. Les cellules satellites peuvent être « réveillées » par la dégénéres-

cence des fibres musculaires ; elles se différencient alors de nouveau, redevenant des myoblastes capables de se diviser et de fusionner les uns aux autres pour former de nouvelles fibres musculaires. Ainsi, la fusion myoblastique ne se produit pas seulement lors de la myogenèse mais aussi durant la régénération musculaire. Cette régénération du muscle débute lorsque les cellules satellites entament une phase de prolifération intensive, en même temps que se ter-

mine la destruction de l'ancienne fibre musculaire. Bien qu'on ignore la nature exacte du stimulus déclenchant la prolifération des cellules satellites, il semble que l'information régulatrice s'exprime à distance, c'est-à-dire au-delà du site de la lésion du tissu musculaire. En effet, certains travaux [16, 17] font état d'une migration des cellules à potentiel myoblastique vers des faisceaux musculaires avoisinants.

Dans la myopathie de Duchenne, le processus de régénération musculaire semble s'épuiser [18]. Bien que le phénotype soit peu apparent chez le jeune patient, les muscles dégèrent à un taux anormalement élevé, exigeant une régénération continue. Progressivement, les fibres musculaires ne peuvent plus se renouveler à un rythme suffisant pour compenser la dégénérescence. Le muscle s'atrophie et les fibres sont remplacées par du tissu conjonctif et adipeux. Dans certains muscles, cette prolifération tissulaire entraîne une pseudo-hypertrophie musculaire.

### Transplantation de myoblastes chez l'animal

Il existe différentes méthodes permettant d'introduire le gène de la dystrophine dans les fibres musculaires des animaux dystrophiques, par exemple la transfection ou l'injection directe de gène et la greffe de myoblastes. Dans cette revue, nous nous attarderons plus spécifiquement à l'injection de myoblastes normaux dans des muscles dystrophiques. L'obtention des myoblastes servant aux greffes nécessite l'utilisation de techniques de clonage et de culture cellulaire spécifiques des cellules musculaires. Il est possible d'obtenir par digestion enzymatique approximativement 60 000 cellules satellites par gramme de muscle. Toutefois, ce nombre peut varier considérablement selon l'individu, son âge et le muscle utilisé. De plus, cette manipulation permet d'obtenir non seulement des cellules satellites, mais aussi des cellules non myogéniques, c'est-à-dire fibroblastes, cellules adipeuses, cellules endothéliales, etc. On doit donc isoler les cellules satellites en utilisant un trieur de cellules ou le clonage cellulaire. Le phénomène de fusion, caractéristique

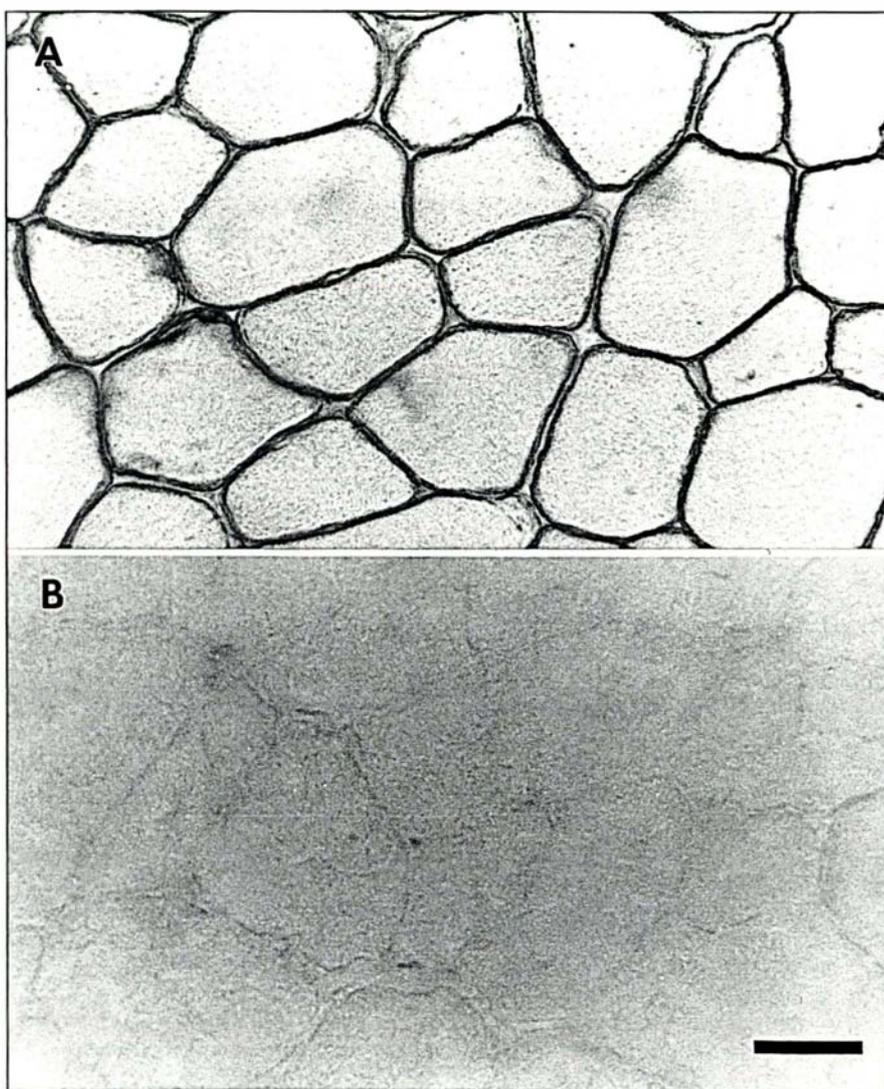


Figure 2. Coupes au cryostat d'un muscle de souris (A) normale et (B) dystrophique (mdx). (A) L'utilisation d'un anticorps spécifique contre la dystrophine permet de démontrer sa présence sous la membrane musculaire de muscles normaux et (B) son absence sur des coupes de muscle de souris mdx. (Échelle 30  $\mu$ m.)

## RÉFÉRENCES

- Jacobs PA, Hunt PA, Mayer M, Bart RD. Duchenne muscular dystrophy (DMD) in a female with an X/autosome translocation : further evidence that the DMD locus is at Xp21. *Am J Hum Genet* 1981 ; 20 : 255-8.
- Monaco AP, Bertelson CJ, Middlesworth W, *et al.* Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. *Nature* 1985 ; 316 : 842-5.
- Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin : the protein product of the Duchenne muscle dystrophy locus. *Cell* 1987 ; 51 : 919-28.
- Sugita H, Arahata K, Ishiguro T, *et al.* Negative immunostaining of Duchenne muscle dystrophy (DMD) and mdx muscle surface membrane with antibody against synthetic peptid fragment predicted from DMD cDNA. *Proc Japan Acad* 1988 ; 64 : 37-9.
- Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Karpatis G, *et al.* The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature* 1988 ; 333 : 466-9.
- Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988 ; 53 : 219-26.
- Watkins DC, Hoffman EP, Slayter HS, Kunkel LM. Immunoelectron microscopic localization of dystrophin in myofibres. *Nature* 1988 ; 333 : 863-6.
- Campbell KP, Kahl SD. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 1989 ; 338 : 259-62.
- Speer A, Spiegler AWJ, Hanke R, *et al.* Possibilities and limitation of prenatal diagnosis and carrier determination for Duchenne and Becker muscular dystrophy using cDNA probes. *J Med Gen* 1989 ; 26 : 1-5.
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CTh. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 1988 ; 16 : 11141-56.
- Hoffman EP. Human molecular genetics and the elucidation of the primary biochemical defect in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Motil Cytoskeleton* 1989 ; 14 : 163-8.
- Nicholson LVB, Johnson MA, Garner-Medwin D, Bhattacharia S, Harris JB. Heterogeneity of dystrophin expression in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Acta Neuropathol (Berl)* 1990 ; 80 : 239-50.

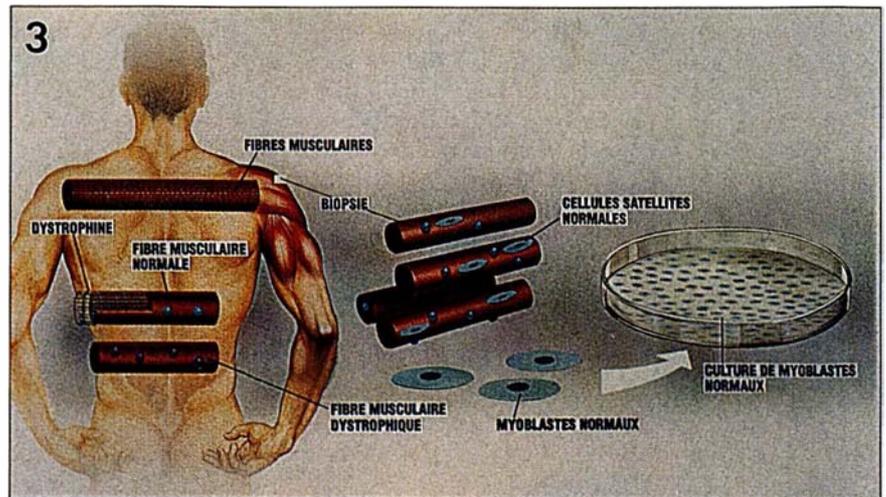


Figure 3. **La dystrophine forme un réseau sous la membrane musculaire normale, mais elle est absente dans les fibres d'un patient atteint de myopathie de Duchenne.** Une biopsie musculaire d'un sujet normal permet d'isoler des cellules satellites. Ces cellules satellites se redifférencient en myoblastes capables de proliférer en culture.

des myoblastes, permet d'identifier les clones de cellules myogéniques. Chaque cellule satellite peut engendrer en quelques semaines environ 10 millions de cellules qui peuvent par la suite être conservées indéfiniment dans l'azote liquide. L'injection de millions de myoblastes permet la formation de cellules musculaires hybrides contenant des noyaux normaux et des noyaux dystrophiques [19, 20] (figure 4). De nombreux travaux expérimentaux ont démontré qu'une cellule musculaire hybride fonctionne normalement [21-25]. On croit en effet que le produit des gènes de chaque noyau pourrait s'étendre dans le sarcolemme commun [26]. Une étude récente a souligné la localisation limitée de certaines protéines musculaires dont la production serait confinée à des « domaines nucléaires » [27]. Il importe donc de savoir si une expression de la dystrophine par un nombre limité de noyaux pourrait conduire à une distribution uniforme de la protéine dans la fibre musculaire. C'est ce que viennent de démontrer tout récemment Huard *et al.* [28]. Même dans des myotubes hybrides formés *in vitro* par fusion d'un seul myoblaste normal et de 11 myoblastes

dystrophiques, la dystrophine est uniformément répartie.

Il y a près de dix ans, Law *et al.* [23] pratiquaient les premières transplantations de myoblastes dans un muscle dystrophique (le soléaire) de souris C57bl/6j<sup>(dy<sup>2j</sup>/dy<sup>2j</sup>)</sup>. Cette lignée de souris possède une mutation qui ne se retrouve ni sur le gène de la dystrophine ni même sur le chromosome X. Ce modèle n'était donc pas idéal pour étudier des dystrophies de types DMD et DMB. Malgré cela, Law *et al.* constataient que six mois après l'injection de cellules provenant de tissu mésenchymateux, le muscle greffé contenait davantage de fibres d'aspect normal que le muscle témoin controlatéral. En effet, les muscles injectés montraient une augmentation de leur masse, de leur section transversale ainsi que de leur nombre de fibres. Le potentiel de repos, soit la différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de ces fibres musculaires, était en moyenne plus élevé que celui des fibres des muscles controlatéraux non injectés. Ce qui est la preuve d'un plus grand pourcentage de fibres saines. Outre ces modifications, on notait une augmentation de la force de contraction isométrique maximale et de la ten-

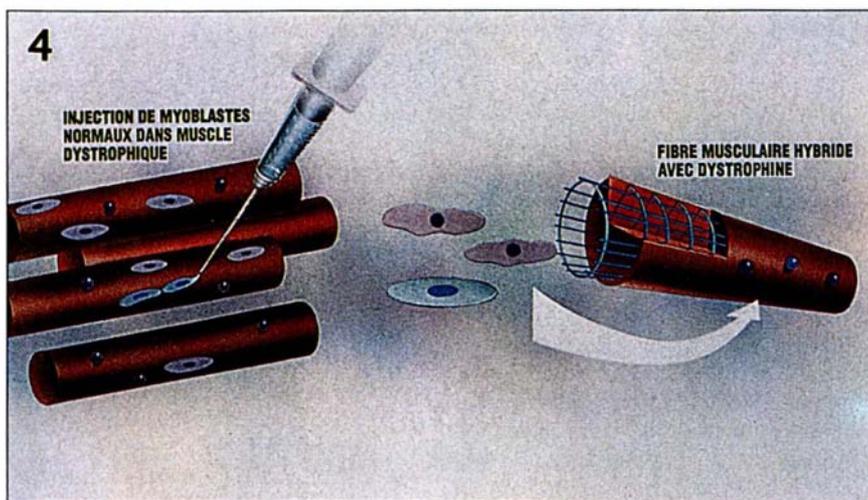


Figure 4. **L'injection de myoblastes normaux dans des muscles dystrophiques permet la formation de cellules musculaires hybrides, c'est-à-dire contenant des noyaux normaux et dystrophiques. Un réseau de dystrophine est présent sous la membrane de ces cellules hybrides.**

sion tétanique qui atteignait alors des valeurs normales. Selon Law, deux mécanismes contribuaient à une telle augmentation de la force musculaire. Premièrement, les myoblastes normaux (donneurs) pouvaient fusionner pour former des myotubes normaux remplaçant petit à petit les fibres dystrophiques. Deuxièmement, les myoblastes normaux pouvaient s'associer à des myoblastes dystrophiques pour former des fibres musculaires hybrides dans lesquelles les noyaux normaux induisaient la formation de protéines non produites par le génome dystrophique. Le produit du gène manquant s'avérait être alors le facteur de correction nécessaire à l'élimination du phénotype de la dystrophie.

Récemment, Bulfield *et al.* identifiaient une souche de souris dystrophique (mdx) [29]. Hoffman *et al.* [30] démontraient que la dystrophie de cet animal était liée à une mutation du gène de la dystrophine entraînant la formation d'un codon stop proche du site d'initiation de la traduction [10]. L'équipe de Partridge montrait qu'après injection de myoblastes normaux dans le muscle de souris mdx, on trouvait de la

dystrophine sous la membrane de fibres musculaires. D'autres travaux ont établi que la transplantation de myoblastes, après destruction du « stock » de cellules régénératrices de l'hôte par irradiation massive (2 500 rad) aux rayons X ou  $\gamma$ , pouvait entraîner une régénération quasi complète du muscle chez les animaux (souris, chien). Le groupe de Fardeau a ainsi obtenu une régénération quasi complète des muscles irradiés, détruits et autotransplantés avec des myoblastes cultivés *in vitro* [31]. Pour sa part, Morgan a obtenu 70 % de fibres musculaires positives pour la dystrophine après avoir greffé des myoblastes normaux dans un muscle dystrophique irradié [25]. Ces deux expériences démontrent la très grande capacité qu'ont les myoblastes transplantés à régénérer le muscle hôte. Morgan a aussi observé que, lorsqu'un muscle de souris mdx greffé avec des myoblastes normaux est mis en culture, certaines cellules forment des myotubes contenant de la dystrophine (communication personnelle). Ce résultat indique que non seulement les myoblastes greffés sont capables de former de nouvelles fibres musculaires, mais aussi

qu'un certain nombre de ces myoblastes (ou leurs descendants) tombent en état de quiescence et sont capables de se multiplier de nouveau pour former de nouvelles fibres musculaires. Dans ces conditions, il ne devrait pas être indispensable d'injecter à plusieurs reprises des myoblastes dans un muscle déjà traité pour y induire une production à long terme de fibres musculaires exprimant la dystrophine.

### **La transplantation de myoblastes chez l'homme**

Quatre équipes de chercheurs ont jusqu'ici effectué des transplantations de myoblastes chez l'homme : celles de P. K. Law, à Memphis (Tennessee, USA), de R. Miller à San Francisco (Californie, USA), de G. Karpatis à Montréal (Québec, Canada) et de J.-P. Tremblay à Québec (Québec, Canada). Il existe des différences importantes dans les expériences entreprises par ces quatre équipes. La sélection des donneurs en est une. Les trois premiers groupes choisissent comme donneur le père ou le frère de l'enfant atteint de myopathie sans exiger une histocompatibilité parfaite. La ciclosporine A et la cyclophosphamide sont alors utilisées pour éviter le rejet. Ces immunosuppresseurs, surtout lorsqu'ils sont employés à long terme, ont des effets secondaires importants. En effet, la ciclosporine est néphrotoxique et peut éventuellement provoquer, par elle-même, une myopathie [32]. Quant à la cyclophosphamide, elle peut entraîner la pancytopénie, la neutropénie ou une cystite hémorragique.

Notre groupe a cherché à réduire le risque de rejet tout en limitant l'utilisation d'immunosuppresseurs. Nous avons choisi un donneur qui soit non seulement de la famille immédiate de l'enfant, mais aussi parfaitement compatible avec le receveur pour les antigènes HLA de classes I (HLA-A, -B, -C) et de classe II (HLA-Dr). Cette restriction dans le choix des donneurs est fondée sur le fait que les myoblastes expriment fortement [33, 34] des antigènes de classe I de façon constitutive. Ces myoblastes peuvent aussi exprimer des HLA de classe II lorsqu'ils sont stimulés par

## RÉFÉRENCES

13. Stockdale FE. Changing levels of DNA polymerase activity during the development of skeletal muscle tissue *in vivo*. *Dev Biol* 1970 ; 2 : 462-74.
  14. Moss FP, Leblond CP. Nature of dividing nuclei in skeletal muscle of growing rats. *J Cell Biol* 1970 ; 44 : 459-62.
  15. Schmalbruch H, Hellhammer U. The number of satellite cells in normal human muscle. *Anat Rec* 1976 ; 185 : 279-88.
  16. Partridge TA, Sloper JC. A host contribution to the regeneration of muscle grafts. *J Neurol Sci* 1977 ; 33 : 425-35.
  17. Watt DJ, Morgan JE, Clifford MA, Partridge TA. The movement of muscle precursor cells between adjacent regenerating muscles in the mouse. *Anat Embryol* 1987 ; 175 : 527-36.
  18. Blau HM, Webster C, Chiu CP, Guttman S, Chandler F. Differentiation properties of pure populations of human dystrophic muscle cells. *Exp Cell Res* 1983 ; 144 : 495-503.
  19. Watt DJ, Lambert K, Morgan JE, Partridge TA, Sloper JC. Incorporation of donor muscle precursor cells into an area of muscle regeneration in the host mouse. *J Neurol Sci* 1982 ; 57 : 319-31.
  20. Watt DJ, Morgan JE, Partridge TA. Use of mononuclear precursor cells to insert allogenic genes into growing mouse muscles. *Muscle Nerve* 1984 ; 7 : 741-50.
  21. Law PK. Beneficial effects of transplanting normal limb-bud mesenchyme into dystrophic mouse muscles. *Muscle Nerve* 1982 ; 5 : 619-25.
  22. Law PK, Goodwin TG, Wang MG. Normal myoblast injections provide genetic treatment for murine dystrophy. *Muscle Nerve* 1988 ; 11 : 525-33.
  23. Morgan JE, Watt DJ, Sloper JC, Partridge TA. Partial correction of a inherited biochemical defect of skeletal muscle by grafts of normal muscle precursor cells. *J Neurol Sci* 1988 ; 86 : 137-47.
  24. Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP, Kunkel LM. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature* 1989 ; 337 : 176-9.
  25. Morgan JE. Normal muscle precursor implants restitute normal histology to degenerating muscles of the mdx mouse. *J Neurol Sci* 1990 ; 98S : 126.
  26. Mintz B, Baker WW. Normal mammalian muscle differentiation and gene control of isocyanate dehydrogenase synthesis. *Proc Nat Acad Sci USA* 1967 ; 58 : 592.
- l'interféron  $\gamma$  résultant de réactions inflammatoires [33, 35]. Nous n'avons pas hésité à recourir à des femmes comme donneurs, même lorsque celles-ci étaient hétérozygotes, puisque 50 % de leurs clones de myoblastes produisent des myotubes contenant de la dystrophine. L'âge des receveurs constitue une deuxième différence. Les équipes des Drs Law, Miller et Karpati, persuadées que la transplantation est plus efficace si elle est faite chez de jeunes patients atteints de myopathie de Duchenne, ont pratiqué leurs premières transplantations chez des enfants âgés de 4 à 10 ans. Nous avons préféré effectuer nos premières transplantations chez des adolescents immobilisés, dans les muscles dont la détérioration était déjà assez avancée, plutôt que de risquer une perte de fonction motrice due au rejet, chez des patients encore mobiles. En effet, une immunocompatibilité parfaite des HLA de classe I et de classe II n'exclut pas la possibilité de rejet des cellules greffées dû aux antigènes « mineurs » d'histocompatibilité qui sont, potentiellement, toutes les protéines du *self*. L'apparition, dans la membrane des fibres musculaires hybrides, du réseau de glycoprotéines transmembranaires associé à la dystrophine pourrait, par exemple, être un élément déclenchant de la réaction immune. Le choix du muscle injecté diffère également. Afin d'éviter une perte de fonction importante, l'équipe du Dr Law a pratiqué ses premières transplantations dans de petits muscles du pied : l'extenseur propre du gros orteil et l'extenseur commun des orteils. Les premières injections de l'équipe du Dr Karpati ont été effectuées dans le biceps brachial alors que celles de l'équipe du Dr Miller et la nôtre avaient comme muscle cible le jambier antérieur. Enfin, le nombre de myoblastes injectés a varié d'une équipe à l'autre de 4 à 100 millions de myoblastes. Le nombre de myoblastes injectés par notre équipe lors de sa première transplantation n'était que de 4 millions de myoblastes ; celle-ci fut suivie de deux transplantations de 10 et 50 millions chacune. Nous sommes les seuls à avoir répété les transplantations chez un même patient et dans plus d'un muscle. L'un de nos patients a déjà reçu six injections dans plusieurs muscles totalisant 800 millions de myoblastes.

## Résultats préliminaires

Jusqu'à présent, aucune équipe n'a rapporté de symptômes cliniques de rejet : douleur, inflammation, rougeur, fièvre. Notre équipe utilise la technique de cytofluorométrie pour déceler la présence d'anticorps contre les myoblastes du donneur dans le sérum [33]. Après plusieurs transplantations chez trois patients, l'un d'entre eux a développé des anticorps contre les myoblastes.

## Présence de dystrophine dans les muscles greffés

L'équipe du Dr Law [36] a été la première à démontrer la présence de dystrophine dans les fibres musculaires des muscles greffés, ceci chez trois enfants. Un seul de ces enfants présentait un grand nombre de fibres musculaires fortement positives pour la dystrophine. L'équipe du Dr Karpati poursuit actuellement une série de transplantations dans un protocole en double aveugle. On ignore donc pour l'instant dans lequel des biceps brachiaux les myoblastes ont été injectés. Cependant, dans des biopsies prélevées dans chacun de ces biceps, certaines contiennent indiscutablement un grand nombre de fibres synthétisant de la dystrophine. Quant à l'équipe du Dr Miller, elle n'a pas rapporté de résultats de biopsie post-greffe puisque sa première transplantation de myoblastes vient d'être réalisée en décembre 1990. Notre équipe a déjà procédé à trois biopsies, pratiquées six à huit semaines après une transplantation de 50 millions de myoblastes dans un seul site. Deux de ces biopsies ont montré que, respectivement, 25 % et 75 % des fibres musculaires étaient fortement immunoréactives pour la dystrophine (figure 5), alors que les fibres du muscle controlatéral ne l'étaient pas [37]. Cependant, aucune fibre positive pour la dystrophine n'a été observée dans la troisième biopsie, correspondant au malade chez lequel des anticorps contre les myoblastes du donneur avaient été détectés par cytofluorométrie. Bien qu'on ait récem-

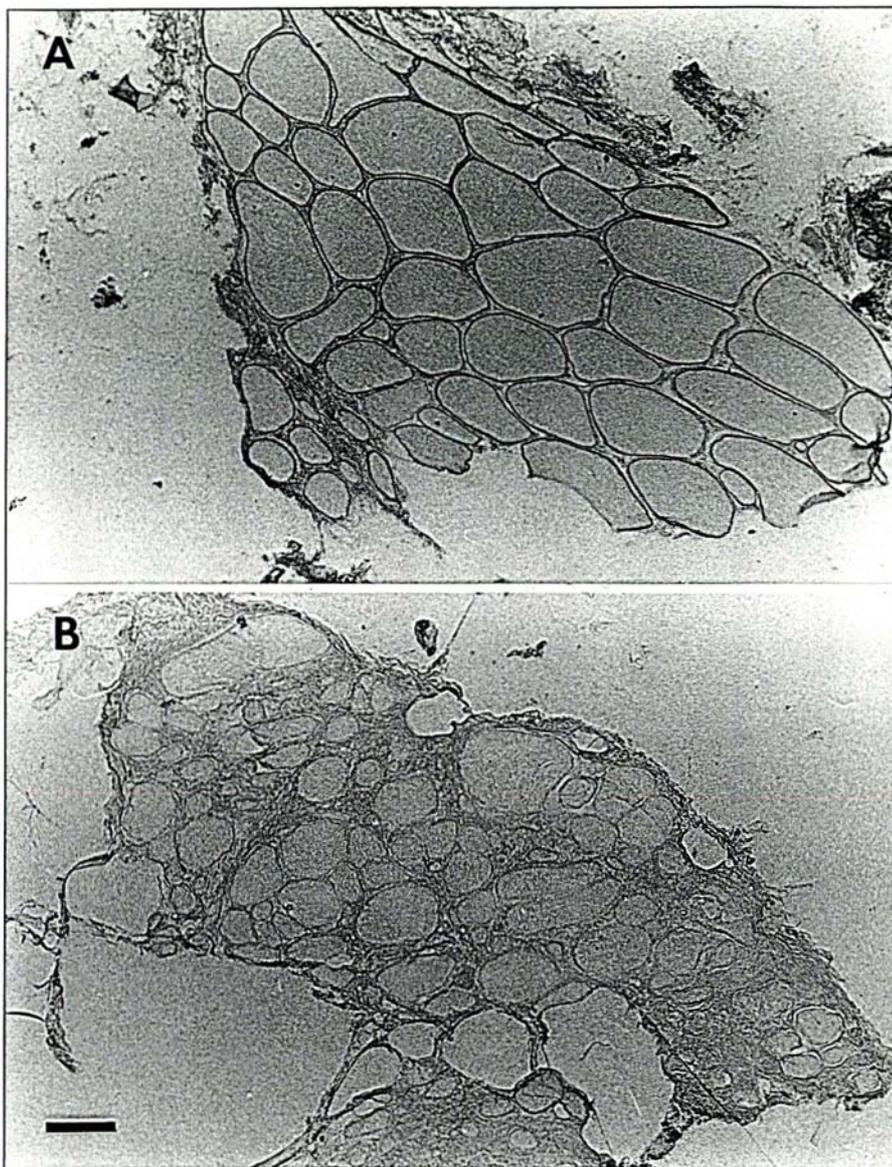


Figure 5. **Coupe au cryostat de muscles prélevés chez un patient dystrophique 4 semaines après la transplantation de 50 millions de myoblastes normaux. (A) Un grand nombre de fibres positives pour la dystrophine sont présentes dans la biopsie du muscle greffé, (B) mais aucune fibre positive n'est présente dans le muscle controlatéral. (Échelle 100  $\mu$ m.)**

ment rapporté [12] la présence de fibres positives pour la dystrophine chez des patients souffrant de myopathie de Duchenne (DMD), celle-ci aurait pour origine une hypothétique mutation somatique inverse et le nombre correspondrait à moins de 1 % de la population totale. Dans certains cas, on retrouverait des petits faisceaux allant jusqu'à 15 fibres con-

tenant une faible immunoréactivité pour la dystrophine. Étant donné la grande proportion de fibres musculaires contenant de la dystrophine dans nos biopsies post-greffe, il est plus probable qu'elles soient le résultat de la greffe plutôt que d'une mutation inverse. Si tel est le cas, cela signifie non seulement que les myoblastes injectés ont survécu, mais

aussi qu'ils ont fusionné entre eux et/ou avec les cellules de l'hôte. Toutefois, pour avoir une preuve définitive, il faudra démontrer par PCR (*polymerase chain reaction*) que l'exon manquant dans le gène de la dystrophine de l'enfant dystrophique est présent dans l'ARN messager des fibres musculaires du muscle greffé.

#### Augmentation de la force musculaire

Après transplantations de 8 millions de myoblastes dans le muscle extenseur commun des orteils chez trois jeunes patients, Law a rapporté des augmentations de la force musculaire atteignant respectivement 18 %, 30 % et 80 % [38]. Le plus haut pourcentage d'augmentation de force (80 %) a été observé chez le garçon dont le muscle était le plus faible. Chez ces enfants, le traitement à la ciclosporine a été interrompu trois mois après l'injection des myoblastes, et cependant, trois mois plus tard, les muscles s'étaient encore légèrement renforcés. Ces observations suggèrent que les myoblastes et les fibres musculaires ne meurent pas et ne sont pas rejetés. Blau a cependant démontré qu'en l'absence de traitement à la ciclosporine, les myoblastes non immunocompatibles disparaissent complètement du site de la greffe en dix jours [39]. Chez les trois enfants ayant reçu des greffes de myoblastes au niveau du biceps brachial dans un protocole en double aveugle, Karpati a mesuré une augmentation de force dans l'un des bras d'un seul des enfants. Au moment où il rapportait ces résultats au congrès sur les maladies neuromusculaires en septembre 1990, il ignorait encore s'il s'agissait du bras injecté avec des myoblastes.

Dans notre série, le patient dont le muscle jambier antérieur présentait 75 % de fibres positives pour la dystrophine après une première injection de myoblastes a reçu ensuite trois autres transplantations dans un muscle extenseur du poignet. La force isométrique des extenseurs du poignet a été évaluée lors de trois contractions volontaires maximales à l'aide d'un dynamomètre manuel, avant et deux mois après cette transplantation. La force est passée de  $16,3 \pm 0,1$  à  $21,3 \pm 0,2$  newtons

## RÉFÉRENCES

27. Pavlath GK, Rich K, Webster SG, Blau HM. Localization of muscle gene products in nuclear domains. *Nature* 1989 ; 337 : 570-3.
28. Huard J, Labrecque C, Dansereau G, Robitaille L, Tremblay JP. Dystrophin expression in myotubes formed by the fusion of normal and dystrophic myoblasts. *Muscle Nerve* 1991 ; 14 : 178-82.
29. Bulfield G, Siller WG, Wight PAL, Moore KJ. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 ; 81 : 1189-92.
30. Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin : the protein product of the Duchenne muscle dystrophy locus. *Cell* 1987 ; 51 : 919-28.
31. Alameddine HS, Dehaupas M, Fardeau M. Regeneration of skeletal muscle fibers from autologous satellite cells multiplied *in vitro*. An experimental model for testing cultured cell myogenicity. *Muscle Nerve* 1989 ; 12 : 544-55.
32. Goy JJ, Stauffer JC, Deruaz JP, et al. Myopathy as possible side-effect of cyclosporin. *Lancet* 1989 ; 1 : 1446-7.
33. Roy R, Dansereau G, Tremblay JP, et al. Expression of major histocompatibility complex antigens on human myoblasts. *Transplant Proc* 1991 ; 23 : 799-801.
34. Hohlfeld R, Engel AG. Lysis of myotubes by alloreactive cytotoxic T cells and natural killer cells. *J Clin Invest* 1990 ; 86 : 370-4.
35. Hohlfeld R, Engel AG. Induction of HLA-DR expression on human myoblasts with interferon-gamma. *Am J Pathol* 1990 ; 136 : 503-8.
36. Law PK, Bertorini TE, Goodwin TG, et al. Dystrophin production induced by myoblast transfert therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet* 1990 ; 336 : 114-5.
37. Tremblay JP, Roy R, Bouchard JP, et al. Human myoblast transplantation. *Proceeding of satellite symposium on muscular dystrophy research 1990 : from molecular diagnosis toward therapy*. 1991 (sous presse).
38. Law PK, Fang Q, Goodwin TG, et al. First clinical trial of myoblast transfer therapy. *J Neurol Sci* 1990 ; 98S : 32.
39. Mantegazza R, Hughes SH, Blau HM, Steinman L. HLA class II antigen expression on human myoblasts : relevance to therapy in Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 1990 ; 98S : 397.
40. Acsadi G, Jiao S, Jani A, et al. Direct transfer and expression into rat heart *in vivo*. *New Biol* 1991 ; 3 : 71-81.

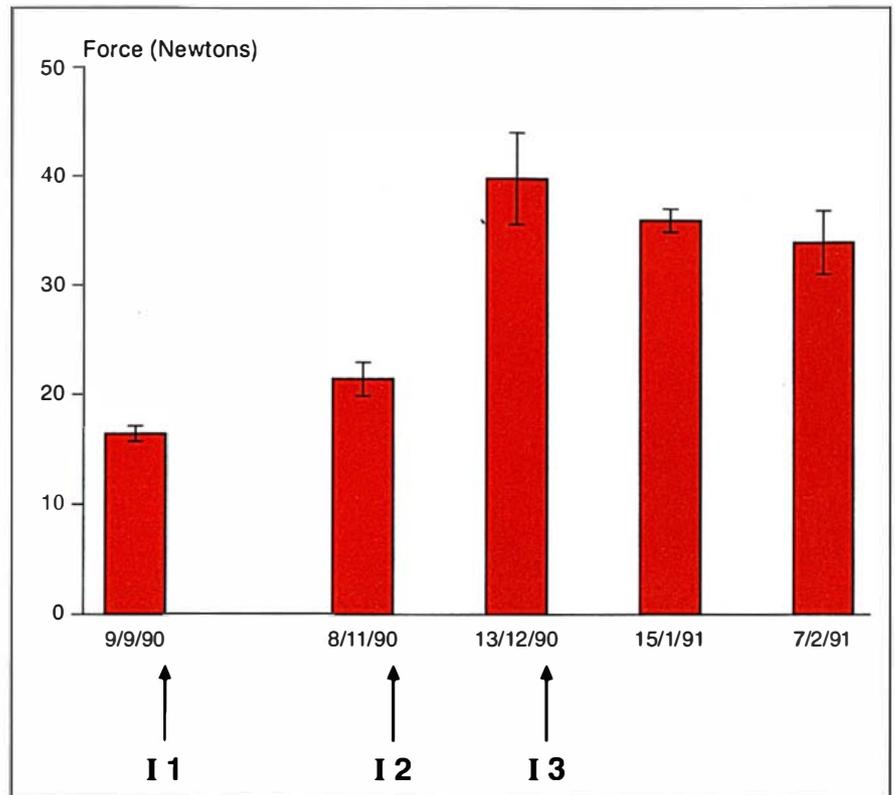


Figure 6. Mesure de la force isométrique volontaire des extenseurs du poignet avant et suivant trois injections de, respectivement,  $I_1 = 60$ ,  $I_2 = 68$  et  $I_3 = 50$  millions de myoblastes. Chaque valeur de force (newtons) représente la moyenne ( $\pm 1$  écart-type) de trois contractions musculaires.

(N), soit une augmentation de 30,7 % (figure 6), alors que celle des extenseurs du poignet controlatéraux avait légèrement diminué. Deux mois plus tard, une deuxième transplantation de 68 millions de myoblastes a été effectuée dans le même muscle. Cinq semaines après la deuxième greffe, la force de ce muscle était de 39,7 N ( $\pm 4,0$ ), soit une augmentation totale de 143 %. Malgré une troisième transplantation de 50 millions de myoblastes, faite un mois plus tard, aucune augmentation ultérieure de force n'a été décelée deux mois plus tard (figure 6). Le patient a aussi spontanément mentionné qu'il était maintenant capable d'effectuer des mouvements avec la main ipsilatérale aux muscles greffés. Cette constatation suggère que l'augmentation de force peut se traduire en une

amélioration fonctionnelle des muscles greffés. De tels résultats sont assez encourageants puisqu'il s'agit d'un garçon de 17 ans, chez qui la faiblesse musculaire était donc très importante.

Des projets pilotes se poursuivent actuellement auprès d'un plus grand nombre de patients. Bien que les résultats obtenus jusqu'à présent permettent un certain optimisme, les augmentations de force obtenues chez seulement quelques patients n'ont restauré qu'une faible partie de la fonction musculaire. Il faudra donc mieux comprendre les mécanismes favorisant la formation de nouvelles fibres musculaires pour améliorer de façon notable le sort de ces patients plus âgés. Par ailleurs, chez les patients plus jeunes, l'injection de myoblastes normaux pourrait ralentir

tir, ou même arrêter, la progression de la maladie. Des études à plus long terme seront nécessaires pour déterminer si un tel objectif peut être atteint.

Les études cliniques mentionnées dans cet article en sont encore à un stade préliminaire ; il est donc encore trop tôt pour savoir si la transplantation des myoblastes sera employée comme thérapie. Si les premiers essais donnent des résultats positifs, il faudra perfectionner les techniques de culture pour diminuer les coûts de production des millions de myoblastes et rendre le traitement accessible à tous les patients. Toutefois, il est clair que même si ce traitement pouvait être employé avec succès sur les muscles striés squelettiques, il sera difficile de traiter le diaphragme. Quant au cœur, étant donné qu'il est dépourvu de système de régénération impliquant des cellules satellites, il ne pourra jamais être traité par cette technique. Le transfert direct d'ADN dans l'organisme, par exemple par injection à l'aide de virus recombinants défectueux pour la réplication, pourrait constituer une approche intéressante si tant est que l'on puisse insérer dans ce type de vecteurs les 14 kb de l'ADNc de la dystrophine. Des transferts directs d'ADN par injection dans le cœur ont été rapportés [40], mais l'on voit mal comment ce mode d'introduction pourrait être réalisé en clinique. En attendant de tels développements, le transfert de myoblastes pourra peut-être améliorer la qualité de vie des patients\* ■

\* Au moment de la correction des épreuves, neuf patients ont reçu des transplantations de myoblastes dans notre laboratoire. La majorité d'entre eux ont, dans le muscle injecté avec des myoblastes, des fibres musculaires contenant de la dystrophine. Cependant, cinq d'entre eux ont développé des anticorps contre les myotubes de leur donneur pourtant compatible pour les HLA de classe I et II DR. Le problème immunologique de telles transplantations demeure donc très important.

## Summary

### Myoblasts transplantation in Duchenne muscular dystrophy

Molecular biology techniques have not only made it possible to identify the gene mutated in Becker and Duchenne muscular dystrophies but also the product of this gene : dystrophin. This protein is located under the membrane of striated muscle fibers. Its absence most likely reduces the resistance of muscle fibers to stretch leading to their eventual necrosis. During normal muscle regeneration, new polynucleated muscle fibers are formed by the fusion of mononucleated myoblasts. Several research teams have suggested on the basis of experiments in animals, that the injection of normal myoblasts into the muscle of a Duchenne patient should lead to the formation of hybrid muscle fibers containing dystrophin. An American team made the first human myoblast transplant at the beginning of 1990. Two Canadian research teams have since also initiated such transplants. The preliminary results of these human myoblast transplants are encouraging. Indeed, dystrophin has been observed in some muscle fibers in muscles that received normal myoblasts and an increase of strength has been documented in some of these muscles. Before such transplants can be considered as a therapy, however, the efficacy of these transplants will have to be improved so that larger strength increases can be obtained and the rejection problem will have to be resolved.

## Remerciements

Nous remercions MM. François Tardif et Jacques Lamontagne (*Magazine Contact, U.L.*) pour les illustrations. Mme Lyse Laroche a assuré le secrétariat du manuscrit. Ce travail a été réalisé grâce au soutien de l'Association de la dystrophie musculaire du Canada et du Conseil de recherches médicales du Canada.

## TIRÉS A PART

C. Labrecque.