

GEOFFREY CAMIRAND

**DÉVELOPPEMENT D'UN PROTOCOLE
D'INDUCTION DE TOLÉRANCE IMMUNOLOGIQUE
APPLICABLE À LA TRANSPLANTATION DE
MYOBLASTES COMME TRAITEMENT DE LA
DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en Microbiologie et Immunologie
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

MAI 2004

© Geoffrey Camirand, 2004

Résumé

La transplantation de myoblastes (cellules précurseurs du muscle) est une thérapie potentielle prometteuse pour le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne. À ce jour, aucun traitement efficace n'existe pour cette maladie. Cette thérapie consiste en l'injection des cellules directement dans le muscle malade. Comme tous les autres types de transplantation allogénique, les myoblastes sont rapidement rejetés par le système immunitaire, mais le rejet peut être contrôlé par l'emploi soutenu d'immunosuppresseurs. L'utilisation de ces immunosuppresseurs serait idéale si ce n'était de leurs effets indésirables importants. Pour contourner ce problème, il est possible d'induire une tolérance immunologique envers les myoblastes transplantés. Cet état de tolérance peut-être induit par deux voies principales : la tolérance périphérique et la tolérance centrale. Plusieurs protocoles d'induction de tolérance périphérique et centrale ont été démontrés efficaces dans la littérature chez des modèles animaux et, dans certains cas, chez l'humain. Nous avons donc appliqué certains de ces protocoles d'induction de tolérance à la transplantation de myoblastes. Lors de cette étude, il est démontré que l'induction de tolérance périphérique, avec les protocoles utilisés, n'ont permis que la prolongation de la survie des myoblastes et qu'une modulation centrale du système immunitaire pourrait améliorer les résultats de survie. C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers l'utilisation de protocoles non-myéloablatifs de greffe de moelle osseuse utilisant des anticorps monoclonaux bloquant les signaux d'activation des lymphocytes. Par le développement de chimérisme, nous avons démontré, pour la première fois, l'induction d'une tolérance robuste et spécifique à la transplantation de myoblastes, sans aucune immunosuppression soutenue. Cette démonstration montre que l'induction de tolérance par modulation centrale pourrait un jour être appliquée à un traitement de transplantation de myoblastes pour la dystrophie musculaire de Duchenne, améliorant ainsi l'espoir d'une qualité de vie meilleure pour ces jeunes malades.

Avant-propos

Je voudrais remercier le Dr Jacques P. Tremblay de m'avoir accueilli dans son laboratoire de recherche pour y effectuer mes études de 3^e cycle. J'ai beaucoup apprécié la formation que j'y ai reçue ainsi que sa grande passion pour la recherche.

Je désire remercier les collaborateurs qui ont participé à ces travaux : les Drs Aldo Rossini, David Rothstein et Megan Sykes.

Je remercie tous les étudiants, stagiaires post-doctoraux, assistants de recherche et techniciens que j'ai côtoyés et qui m'ont donné coups de main et conseils pour progresser et achever ce travail: Nicolas Caron, Simon Quenneville, Lionel Stéphan, Marie-Ève Ducharme, Joël Rousseau, Mélanie Sackett, Philippe Mills, Daniel Skuk, Marlyne Goulet et Brigitte Roy.

Je désire aussi remercier énormément une personne très spéciale qui représente pour moi une source de motivation quotidienne. Cette personne est à la fois ma meilleure amie et ma copine de cœur, Cathy. Merci Cathy pour tout ce que tu as fait pour moi; je ne l'oublie pas, je t'aime.

Un dernier remerciement à mes parents, Denis et Jeanne pour leur support et leur amour.

Les résultats des travaux sont imprimés ici en manuscrits d'article. La préparation de ces manuscrits ainsi que les expériences ont été exécutées en presque totalité par le candidat.

Table des matières

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE 1. LE MUSCLE SQUELETTIQUE.....	4
1.1 ANATOMIE	4
1.2 LES TYPES DE FIBRES MUSCULAIRES	4
1.3 RÉGÉNÉRATION DU TISSU MUSCULAIRE.....	7
CHAPITRE 2. LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE	8
2.1 HISTORIQUE	8
2.2 LA PATHOLOGIE.....	9
2.3 LA CAUSE GÉNÉTIQUE	11
2.4 LA DYSTROPHINE	12
2.4.1 LES MUTATIONS	13
2.4.2 COMPLEXE GLYCOPROTÉIQUE ASSOCIÉ À LA DYSTROPHINE	14
2.4.3 RÔLES DU COMPLEXE ASSOCIÉ À LA DYSTROPHINE	18
2.5 LES MODÈLES ANIMAUX	19
2.5.1 LA SOURIS <i>MDX</i>	20
2.5.2 DYSTROPHIE MUSCULAIRE CANINE.....	21
2.5.3 DYSTROPHIE MUSCULAIRE FÉLINE.....	21
2.6 LES THÉRAPIES	21
2.6.1 LA THÉRAPIE PAR MÉDICAMENT.....	22
2.6.2 LA THÉRAPIE GÉNIQUE	22
2.6.3 LA THÉRAPIE CELLULAIRE	24
2.6.3.1 Transplantation de myoblastes normaux.....	24
2.6.3.2 Les essais cliniques précoces de transplantation de myoblastes.....	25
2.6.3.3 Résultats de l'expérimentation animale de transplantation de myoblastes.....	27
2.6.3.4 Autres applications de la transplantation de myoblastes.....	32
2.6.3.5 Thérapie par l'utilisation de cellules souches	33
CHAPITRE 3. LE SYSTÈME IMMUNITAIRE	34
3.1 INTRODUCTION À L'IMMUNOBIOLOGIE.....	34
3.2 MÉCANISMES DE RÉPONSE IMMUNITAIRE.....	36
3.2.1 MÉCANISME DE RECONNAISSANCE DES ANTIGÈNES PAR LES LYMPHOCYTES	36
3.2.1.1 Le complexe majeur d'histocompatibilité.....	37
3.2.1.2 Le récepteur des cellules T (RcT).....	41
3.2.1.3 Le récepteur des lymphocytes B (RcB)	42
3.2.1.4 Les immunoglobulines (Ig).....	42
3.2.2 LA MATURATION LYMPHOCYTAIRE	44
3.2.2.1 Principe de sélection thymique	45
3.2.2.2 Principe de sélection des lymphocytes B.....	49

3.2.3 ACTIVATION DES CELLULES EFFECTRICES DU SYSTÈME IMMUNITAIRE.....	52
3.2.3.1 Activation des lymphocytes T CD4 ⁺	52
3.2.3.2 Activation des lymphocytes T CD8 ⁺	55
3.2.3.3 Activation des lymphocytes B.....	56
3.2.3.4 Absence de co-stimulation : anergie.....	57
3.2.3.5 Signalisation intracellulaire lymphocytaire.....	57
<u>CHAPITRE 4. TRANSPLANTATION ET TOLÉRANCE IMMUNOLOGIQUE.....</u>	61
4.1 LES DIFFÉRENTS TYPES DE TRANSPLANTATION	61
4.2 LES ASPECTS DU REJET DE GREFFE	62
4.2.1 MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LE REJET DE GREFFE.....	62
4.2.1.1 Phase de sensibilisation.....	62
4.2.1.2 La phase effectrice.....	63
4.2.2 LES TYPES DE REJET	65
4.2.2.1 Le rejet hyperaigu.....	65
4.2.2.2 Le rejet aigu.....	66
4.2.2.3 Le rejet chronique.....	66
4.2.3 GVHD.....	66
4.2.4 LES IMMUNOSUPPESSEURS.....	67
4.3 L'INDUCTION DE TOLÉRANCE.....	68
4.3.1 MÉCANISMES DE TOLÉRANCE IMMUNOLOGIQUE.....	69
4.3.1.1 Délétion clonale.....	69
4.3.1.2 Anergie clonale.....	71
4.3.1.3 Régulation/suppression.....	71
4.3.2 PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX DE TOLÉRANCE PÉRIPHÉRIQUE.....	72
4.3.2.1 Blocage des co-récepteurs.....	73
4.3.2.2 Blocage de la co-stimulation.....	73
4.3.3 PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX DE TOLÉRANCE CENTRALE.....	77
4.3.3.1 Chimérisme avec des drogues cytoréductrices.....	80
4.3.3.2 Chimérisme avec des anticorps monoclonaux.....	80
<u>CHAPITRE 5. LE TRAITEMENT AVEC L'ANTICORPS ANTI-CD154 ET UNE</u>	
<u>TRANSFUSION DE SPLÉNOCYTES DU DONNEUR PRÉVIENT LE</u>	
<u>REJET AIGU DE MYOBLASTES TRANSPLANTÉS.....</u>	87
5.1 RÉSUMÉ.....	88
5.2 TITRE: TREATMENT WITH ANTI-CD154 ANTIBODY AND DONOR-SPECIFIC TRANSFUSION	
PREVENTS ACUTE REJECTION OF MYOBLAST TRANSPLANTATION¹.....	89
5.2.1 FOOTNOTES:.....	90
5.2.2 ABBREVIATIONS:.....	91
5.2.3 KEY WORDS.....	91
5.3 ABSTRACT	92
5.4 INTRODUCTION	93
5.5 MATERIALS AND METHODS	94
5.6 RESULTS	99
5.7 DISCUSSION	108
5.8 REFERENCES	112

CHAPITRE 6. INDUCTION DE TOLÉRANCE À LA TRANSPLANTATION DE MYOBLASTES EN DÉVELOPPANT UN CHIMÉRISME MIXTE À L'AIDE D'UN PROTOCOLE NON-MYELOABLATIF 117

6.1 RÉSUMÉ	118
6.2 TITRE: TOLERANCE TO MYOGENIC CELL TRANSPLANTATION IN MURINE MIXED ALLOGENEIC CHIMERAS INDUCED BY NON-MYELOABLATIVE CONDITIONING.....	119
6.3 ABSTRACT	120
6.4 INTRODUCTION	121
6.5 MATERIALS AND METHODS	123
6.6 RESULTS	127
6.7 DISCUSSION	142
6.8 ACKNOWLEDGMENT.....	144
6.9 REFERENCES	145
6.10 TABLES AND FIGURES.....	149

CHAPITRE 7. NOUVEAU TRAITEMENT DE LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE PAR L'INDUCTION DE TOLÉRANCE IMMUNOLOGIQUE UTILISANT L'ANTI-CD45RB, L'ANTI-CD154 ET LE CHIMÉRISME MIXTE 150

7.1 RÉSUMÉ	151
7.2 TITRE: NOVEL DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY TREATMENT THROUGH MYOBLAST TRANSPLANTATION TOLERANCE USING ANTI-CD45RB, ANTI-CD154 AND MIXED CHIMERISM.....	152
7.3 FOOTNOTES	153
7.4 ABSTRACT	154
7.5 INTRODUCTION	155
7.6 METHODS	158
7.7 RESULTS	163
7.8 DISCUSSION	179
7.9 ACNOWLEDGMNETS.....	184
7.10 REFERENCES	185

DISCUSSION GÉNÉRALE..... 190

CONCLUSION GÉNÉRALE 195

ABRÉVIATIONS..... 197

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 199

Liste des tableaux

TABLEAU 4.1 : RÉSUMÉ DES DIFFÉRENTS PROTOCOLES DE TOLÉRANCE PÉRIPHÉRIQUE CHEZ LES RONGEURS UTILISANT DES ANTICORPS MONOCLONAUX NON-DÉPLÉTANTS.....	76
TABLEAU 4.2 : RÉSUMÉ DES DIFFÉRENTS PROTOCOLES NON-MYÉLOABLATIF DE TOLÉRANCE CENTRALE PAR CHIMÉRISME MIXTE CHEZ LES RONGEURS. TOUS CES PROTOCOLES ONT INDUIT UN MACROCHIMÉRISME CHEZ LA MAJORITÉ DES RECEVEURS ET ONT INDUIT UNE TOLÉRANCE À DES GREFFES DE PEAU.	82
TABLE 5.1. TIME COURSE OF GRAFT RESULTS AND IMMUNE RESPONSES FOLLOWING MYOBLAST TRANSPLANTATION AFTER DST + ANTI-CD154 MAB TREATMENTS .	100
TABLE 6.1. MYOBLAST TRANSPLANTATION AND LYMPHOCYTIC INFILTRATION RESULTS..	129
TABLE 6.2. RESULTS OF RECHALLENGE WITH A SECOND MYOBLAST TRANSPLANTATION.	138
TABLE 7.1. MYOBLAST TRANSPLANTATION AND HISTOLOGY RESULTS IN EACH TREATMENT GROUP:	167
TABLE 7.2. MYOBLAST TRANSPLANTATION (MT) RECHALLENGE RESULTS	172

Liste des figures

FIGURE 1.1: ANATOMIE DU MUSCLE SQUELETTIQUE AU NIVEAU MACROSCOPIQUE ET MICROSCOPIQUE	5
FIGURE 2.1: DESSINS DE GOWER D'UN ENFANT ATTEINT DE DYSTROPHIE MUSCULAIRE SE LEVANT DU SOL.....	10
FIGURE 2.2: SCHÉMA DU COMPLEXE GLYCOPROTÉIQUE ASSOCIÉ À LA DYSTROPHINE.	17
FIGURE 2.3 : SCHÉMA DE LA TRANSPLANTATION DE MYOBLASTES NORMAUX COMME THÉRAPIE DE LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE.	26
FIGURE 3.1 : HÉMATOPOÏÈSE DU SYSTÈME IMMUNITAIRE ORIGINANT D'UNE CELLULE SOUCHE DE LA MOELLE OSSEUSE.....	35
FIGURE 3.2: LES COMPLEXES MAJEURS D'HISTOCOMPATIBILITÉ MURIN ET HUMAIN	39
FIGURE 3.3: LA STRUCTURE DES CMH DE CLASSE I ET DE CLASSE II.....	40
FIGURE 3.4 : SCHÉMA D'UNE IMMUNOGLOBULINE. C : PARTIES CONSTANTES, V : PARTIES VARIABLES.	43
FIGURE 3.5 : SCHÉMA D'UNE PARTIE DU THYMUS OÙ S'EFFECTUE LA SÉLECTION THYMIQUE	46
FIGURE 3.6 : DÉVELOPPEMENT DES LYMPHOCYTES T AU NIVEAU THYMIQUE.....	47
FIGURE 3.7 : PROPORTION DES LYMPHOCYTES T SURVIVANT UNE SÉLECTION THYMIQUE SELON LEUR AFFINITÉ RCT-CMH.....	50
FIGURE 3.8 : SCHÉMA DES INTERACTIONS D'UN LYMPHOCYTE AVEC UNE CPA.	53
FIGURE 3.9 : RÉSUMÉ SCHÉMATIQUE DES SIGNAUX D'ACTIVATION INTRACELLULAIRE DES LYMPHOCYTES T CD4+.....	60
FIGURE 4.1 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES MÉCANISMES DE REJET DE GREFFES	64
FIGURE 4.2 : SCHÉMA DES MÉCANISMES IMPLIQUÉS LORS DE L'INDUCTION DE TOLÉRANCE CENTRALE PAR CHIMÉRISME MIXTE EN UTILISANT UN PROTOCOLE NON-MYÉLOABLATIF DE GREFFE DE MOELLE OSSEUSE COMBINÉ AU BLOCAGE DES SIGNAUX DE CO-STIMULATION DES LYMPHOCYTES T.....	84
FIGURE 5.2: SEMI-QUANTITATIVE RT-PCR FOR CYTOKINE PROFILE AND GRANZYME B.....	103
FIGURE 5.3: IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING TO CONFIRM THE EXPRESSION OF INF- γ AND IL-10 IN THE MUSCLE OF MICE TREATED WITH DST + ANTI-CD154..	104
FIGURE 5.4: MICROCHIMERISM DETECTION OF MALE DONOR GENOMES BY COMPETITIVE PCR AMPLIFICATION OF THE Y CHROMOSOME.....	106
FIGURE 6.1: MEAN PERCENTAGE (\pm SD) OF DONOR WBC OVER TIME OBTAINED BY LETHAL IRRADIATION AND BM RECONSTITUTION OF MDX MICE USING BM CELLS	128
FIGURE 6.2: CHIMERISM USING LETHAL TBI LED TO LONG-TERM SURVIVAL OF MYOBLAST TRANSPLANTATION	130
FIGURE 6.4: MIXED CHIMERISM USING NON-MYELOABLATIVE BMT, ANTI-CD154 AND ANTI-CD8	133
FIGURE 6.5: CHIMERISM OBTAINED USING NON-MYELOABLATIVE CONDITIONING LED TO LONG-TERM SURVIVAL OF DONOR MYOBLAST TRANSPLANTS.....	135

FIGURE 6.6: RECHALLENGE WITH A SECOND MT DEMONSTRATES TOLERANCE IN TRANSIENT AND DURABLE MIXED CHIMERAS.....	137
FIGURE 6.7: LONG-TERM SURVIVAL OF DONOR SKIN GRAFTS ON CHIMERIC MICE.....	140
FIGURE 6.8: LYMPHOCYTIC INFILTRATION IN MUSCLES INJECTED WITH MYOBLASTS, BUT NOT IN LONG-TERM SURVIVING SKIN GRAFTS.....	141
FIGURE 7.1. HIGH LEVELS OF LYMPHOID CHIMERISM OBSERVED IN PERIPHERAL BLOOD AFTER BMT IN MICE TREATED WITH LOW DOSE OF IRRADIATION PLUS ANTI-CD154 AND ANTI-CD45RB MABS.....	164
FIGURE 7.2. REPRESENTATIVE DYSTROPHIN EXPRESSION IN TA MUSCLE SECTIONS FROM MDX MICE IN VARIOUS TREATMENT GROUPS.....	166
FIGURE 7.3. LONG-TERM (> 100 DAYS) EXPRESSION OF DYSTROPHIN IN CHIMERIC MICE INDUCED WITH NON-MYELOABLATIVE PROTOCOL	169
FIGURE 7.5. ROBUST DONOR-SPECIFIC TOLERANCE INDUCED BY WBI + FULLY-ALLOGENEIC BMT + ANTI-CD45RB + ANTI-CD154	173
FIGURE 7.6. DELETION OF DONOR-REACTIVE PERIPHERAL CD4+ VB11+ HOST CELLS IN LONG-TERM CHIMERA RECEIVING FULLY ALLOGENEIC (BALB/C) BONE MARROW CELLS AFTER WBI AND VARIOUS TREATMENT REGIMENS	175
FIGURE 7.7. REPRESENTATIVE HISTOLOGICAL ANALYSIS OF MUSCLE AND SKIN GRAFT SECTIONS	178

Introduction générale

La dystrophie musculaire de Duchenne est une maladie héréditaire causée par une mutation dans le gène de la dystrophine. La mutation produit une protéine tronquée et non-fonctionnelle. Le locus du gène de la dystrophine est situé sur le chromosome X, ce qui en fait une maladie liée au sexe. L'absence de dystrophine rend les fibres musculaires plus sensibles aux bris et cassures lors d'exercices physiques. Les muscles squelettiques et cardiaques subissent alors une dégénérescence graduelle menant à un déficit important de la capacité contractile. Les patients décèdent vers l'âge de 20 ans d'insuffisance cardiaque ou respiratoire (Engel et al. 1994).

Les recours thérapeutiques des patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne sont plutôt limités à ce jour. La thérapie par transplantation de myoblastes se présente comme le moyen le plus prometteur et permettrait d'améliorer la qualité de vie de ces patients. Cette approche consiste à injecter, à l'intérieur du muscle atteint, des cellules normales précurseurs du tissu musculaire, appelées myoblastes. Suite à leur injection, les cellules fusionnent entre elles ou avec les fibres musculaires de l'hôte, générant ainsi une expression de dystrophine fonctionnelle à l'intérieur de ces fibres. De plus, certaines cellules injectées restent aussi au stade mononucléées (indifférenciées) et accolées aux fibres musculaires. Celles-ci serviront à régénérer le muscle lors de bris subséquents (Morgan et al. 1993).

L'approche thérapeutique par transplantation de myoblastes présente plusieurs obstacles: 1) environ 80% des myoblastes meurent dans les trois jours suivant leur transplantation (Guerette et al. 1997a; Guerette et al. 1997b; Merly et al. 1998). Ce problème peut être surmonté en injectant une quantité plus importante de cellules; 2) les cellules injectées ne migrent pas plus d'un millimètre du site d'injection à l'intérieur du muscle. L'injection de cellules, en des trajectoires très rapprochées, permet une distribution adéquate des cellules à l'intérieur du muscle (Skuk et al. 1999b); 3) la transplantation allogénique de myoblastes génère une réponse immunitaire spécifique. Cette dernière peut

être surmontée par une immunosuppression soutenue au Tacrolimus (FK506) (Kinoshita et al. 1994).

L'obstacle #3, i.e. la réponse immune spécifique, est le problème d'intérêt de cette étude. En effet, malgré le contrôle efficace du rejet immunitaire par l'utilisation soutenue d'immunosuppresseurs, cette solution s'accompagne d'effets secondaires importants. La sévérité de ces effets varie selon l'immunosuppresseur, mais communément, on observe une sensibilité élevée aux infections et un risque élevé de développement de cancer (Philip et al. 1998; Vial et al. 2003). De plus, les résultats précliniques suggèrent que le succès des transplantations des myoblastes est conditionnel à l'utilisation du Tacrolimus (FK506). Cependant, l'utilisation soutenue du Tacrolimus peut engendrer des effets secondaires indésirables comme une néphrotoxicité, une neurotoxicité et le diabète (Wijdicks et al. 1994; Tanabe et al. 1996; Bennett 1998). Une avenue possible pour contrer le rejet immunitaire et les effets indésirables des immunosuppresseurs est d'induire une tolérance immunologique spécifique.

La tolérance immunologique consiste à moduler le système immunitaire pour qu'il ne reconnaisse plus les cellules ou les organes transplantés comme étrangers, sans affecter ses fonctions de défense contre les infections et autres. La tolérance peut être obtenue en modulant soit le système immunitaire périphérique ou le système immunitaire central. L'induction de tolérance périphérique a été démontrée en 1992 avec l'utilisation d'anti-CD4 et d'anti-CD8 non-déplétants (Chen et al. 1992). Depuis ce temps, une multitude de protocoles ont été développés utilisant des anticorps dirigés contre les molécules de co-stimulation des lymphocytes. Ces protocoles ont démontré la survie à long terme de différents types de greffes chez la souris et chez le singe. Certains ont aussi été démontrés efficaces lors de xénotransplantations (Waldmann et al. 2001b). Dans le cas de l'induction de tolérance centrale, celle-ci a été démontrée dans les années 50 avec les travaux pionniers de Medawar et al. (Billingham et al. 1953). Depuis ce temps, plusieurs protocoles d'induction de tolérance centrale ont été développés, visant à diminuer les effets toxiques des traitements myéloablatifs (Sykes 2001).

L'objectif principal de cette étude est de transposer et de développer un protocole d'induction de tolérance chez la souris qui permettrait la survie à long terme des myoblastes

transplantés. Plusieurs approches seront envisagées utilisant l'induction de tolérance périphérique et centrale.

Les chapitres qui suivent présentent une description du tissu musculaire squelettique (Chapitre 1), de la dystrophie musculaire de Duchenne (Chapitre 2), du système immunitaire (Chapitre 3), de l'immunobiologie de la transplantation et des différents aspects de l'induction de tolérance immunologique (Chapitre 4). Le Chapitre 5 contient un article scientifique publié dans la revue *Transplantation*. Cet article décrit les méthodes utilisées ainsi que les résultats obtenus suite l'induction de tolérance périphérique utilisant un traitement composé d'une transfusion de splénocytes du donneur et d'anti-CD154 pour la transplantation de myoblastes. Le Chapitre 6 contient un article scientifique soumis pour publication à la revue *The American Journal of Transplantation*, contenant les résultats de survie des myoblastes obtenus lors d'une induction de tolérance centrale médiée par un protocole non-myéloablatif constitué d'anticorps anti-CD8 et anti-CD154, d'une faible dose d'irradiation de 3 Gy et d'une greffe de moelle osseuse. Et finalement, le Chapitre 7 contient un article scientifique soumis pour publication à la revue *The Journal of Immunology*, contenant les résultats de survie des myoblastes en utilisant un nouveau protocole non-myéloablatif que nous avons développé, constitué d'anticorps anti-CD45RB et anti-CD154, d'une faible dose d'irradiation de 3 Gy et d'une greffe de moelle osseuse.

Chapitre 1. Le muscle squelettique

1.1 Anatomie

L'unité de base du tissu musculaire squelettique est la fibre musculaire. Ces fibres s'apparentent à de longues formes cylindriques contenant noyaux, mitochondries, réticulum endoplasmique et myofibrilles (Tortora et al. 1994). Les fibres sont disposées parallèlement. Elles mesurent de 10 à 100 μm de diamètre et peuvent atteindre 30 cm de longueur. Chaque fibre est formée de la fusion de plusieurs centaines de cellules appelées myoblastes. Les noyaux des fibres musculaires sont accolés à la membrane plasmique (sarcolemme), ne nuisant pas aux éléments contractiles. Chaque fibre musculaire est formée de myofibrilles, elles-mêmes constituées des structures contractiles (Figure 1.1).

Plusieurs couches de tissus conjonctifs séparent et protègent les composantes des muscles squelettiques. L'endomysium sépare chaque fibre musculaire, le pérимыsium organise de 10 à 100 fibres musculaires en faisceaux et l'épимыsium est la couche extérieure qui enveloppe tout le muscle. Ces membranes fournissent des fibres collagènes aux tissus conjonctifs qui attachent le muscle à d'autres structures (muscle, os, tendons) (Figure 1.1).

1.2 Les types de fibres musculaires

On distingue trois principaux types de fibres musculaires squelettiques, variant selon leur teneur en myoglobine, nommées fibres rouges, fibres intermédiaires ou fibres blanches (Tortora et al. 1994). La myoglobine est une protéine qui emmagasine l'oxygène à l'intérieur du muscle. Les fibres rouges possèdent plus de mitochondries et de capillaires que les blanches. Les types de fibres possèdent aussi des métabolismes différents, comme une teneur variée en ATPase (adénosine-triphosphatase), résultant en différentes vitesses de contraction et différentes résistances à la fatigue. La classification se dessine ainsi :

Fibres de Type I : fibres oxydatives à **contraction lente** et **résistantes à la fatigue**. Ces fibres contiennent beaucoup de myoglobine, de mitochondries et de capillaires (fibres

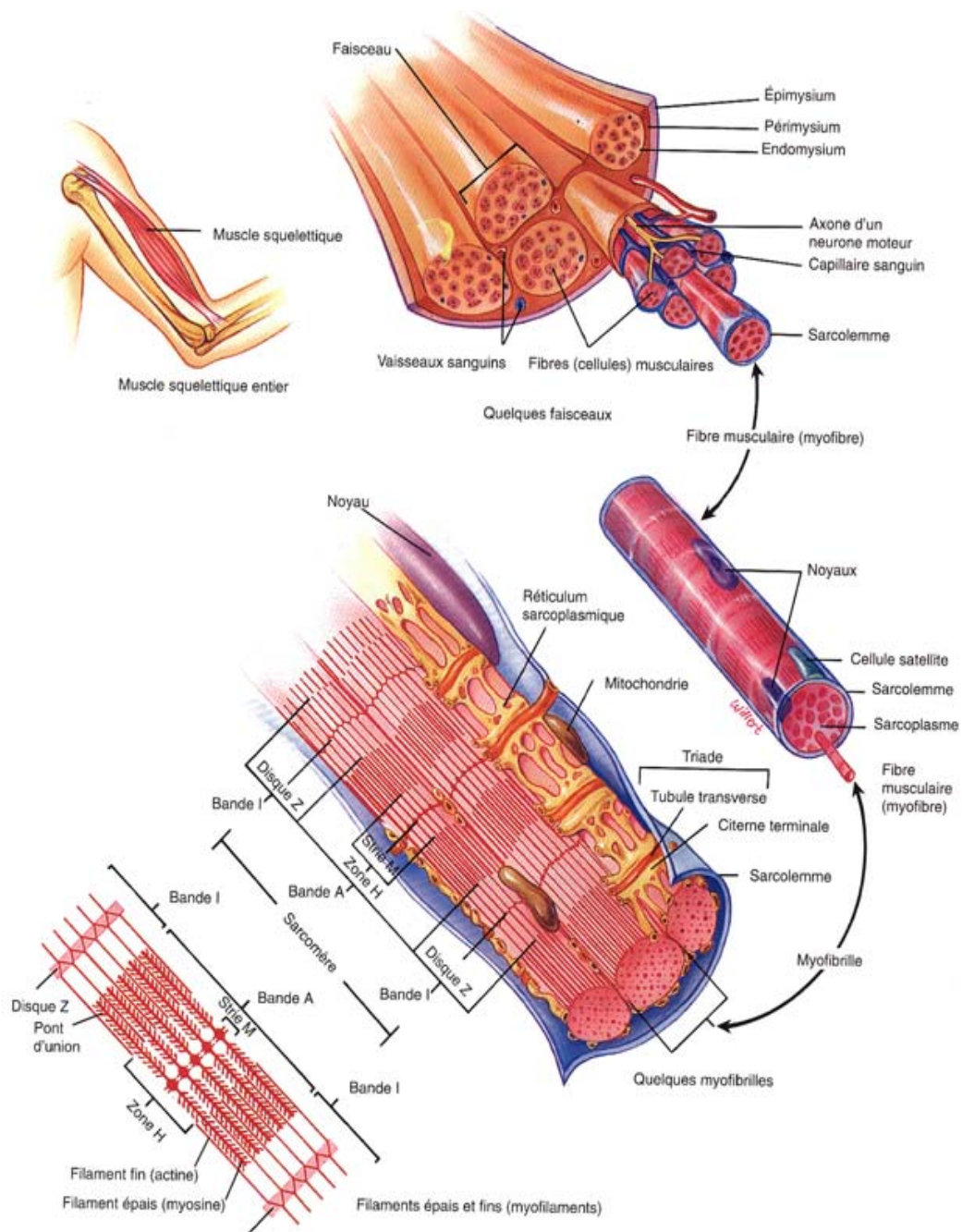


Figure 1.1: Anatomie du muscle squelettique au niveau macroscopique et microscopique.

(Tortora et al. 1994)

rouges). Ce sont des fibres qui scindent lentement l'ATP (adénosine-triphosphate) et sont petites en diamètre. Elles sont surtout retrouvées dans les muscles posturaux comme les muscles du cou.

Fibres de Type IIA : fibres oxydatives à **contraction rapide** et **résistantes à la fatigue**. Ces fibres contiennent beaucoup de myoglobine, de mitochondries et de capillaires mais, elles possèdent une coloration intermédiaire (fibres intermédiaires). Elles se retrouvent généralement en grand nombre dans les muscles de la jambe des athlètes.

Fibres de Type IIB : fibres glycolytiques à **contraction rapide** et **sensibles à la fatigue**. Ces fibres contiennent peu de myoglobine, de mitochondries et de capillaires (fibres blanches). Elles ont une haute teneur en glycogène et possèdent le plus grand diamètre. On les retrouve en grand nombre dans les muscles du bras.

Les fibres oxydatives produisent de l'ATP par le système aérobie, tandis que les fibres glycolytiques le produisent par le système anaérobie (système plus lent, donc les fibres sont plus sensibles à la fatigue). Même si la plupart des muscles squelettiques contiennent une combinaison des trois types de fibres, les fibres d'une même unité motrice sont toutes d'un seul type. Une unité motrice est formée par un neurone moteur ainsi que toutes les fibres musculaires que ce dernier stimule. Les différents types sont utilisés selon le besoin de la contraction. Par exemple, un effort léger, nécessitant une faible contraction, n'activera que les unités motrices reliées aux fibres de type I (contraction lente); un effort plus soutenu (contraction forte) activera les fibres à contraction rapide de type IIB et un effort intense, nécessitant une contraction maximale, activera en plus les fibres IIA qui sont résistantes à la fatigue.

Un athlète qui effectue un sport d'endurance (course ou natation par exemple) modifie graduellement certaines fibres glycolytiques (type IIB) en fibres oxydatives (type IIA). Généralement, le nombre total des fibres musculaires squelettiques ne varie pas. Ces fibres musculaires transformées présentent un diamètre plus élevé, un nombre de mitochondries et de capillaires plus grand et une force accrue. Dans ce type d'entraînement, la masse musculaire augmente peu. En opposé, les haltérophiles, qui demandent une force élevée pendant un court laps de temps, accroissent la taille et la force des fibres

glycolytiques à contraction rapide. Cet accroissement de la taille est dû à une synthèse accrue des filaments fins et épais.

1.3 Régénération du tissu musculaire

Comme mentionné précédemment, l'augmentation de la masse musculaire est attribuable à l'élargissement des cellules existantes (hypertrophie) plutôt qu'à une augmentation du nombre de fibres (hyperplasie). Cet élargissement s'effectue par la fusion des cellules satellites avec des fibres existantes (muscle mature) ou entre elles (postnatal) (Tortora et al. 1994). Ces cellules satellites sont des cellules souches inactives accolées aux fibres musculaires. Elles possèdent un potentiel régénératoire limité puisqu'une lésion importante transforme le tissu musculaire en du tissu cicatriciel fibreux (fibrose). Lors du vieillissement, le nombre relatif de fibres de type I (contraction lente) augmente, ce qui est attribuable soit à une atrophie des autres types de fibres, soit à la conversion des fibres de type II en type I. Par contre, ce phénomène peut être soit lié au vieillissement, soit à une activité physique plus limitée des personnes plus âgées.

Chapitre 2. La dystrophie musculaire de Duchenne

2.1 Historique

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) a été caractérisée en 1861 par Duchenne de Boulogne (ou Guillaume Benjamin Amand Duchenne, 1806-1875) (Duchenne, G. B. 1861). Cette maladie porte son nom même si William John Little (1810-1894) et Edward Meyron (1807-1880) l'ont caractérisée précédemment. Little a publié son livre en 1853 (Little 1853); on y retrouve le contenu de ses observations durant les années 1843-1844, au “ Royal Orthopedic Hospital ”, à Londres, où il décrit, avec une certaine précision, la pathologie chez deux frères de 12 et 14 ans, les ayant étudiés depuis leur jeune âge. Un an avant la publication du livre de Little, soit en 1852, Edward Meyron décrivit la maladie chez quatre frères d'une même famille (Engel et al. 1994). Ses descriptions furent aussi précises et claires que celles de Little et il attribua la cause de la maladie à une carence en éléments nutritionnels. Duchenne attribua, pour sa part, la cause de la maladie à un désordre cérébral et la nomma “ paraplégie hypertrophique de l'enfance ”. Par contre, en 1868, il découvrit que ce trouble était relié aux muscles (Duchenne, Guillaume Benjamin Amand 1868). Il proposa alors des critères diagnostiques basés sur des observations anatomiques et des stimulations électriques. Il décrivit aussi le remplacement du tissu musculaire par le tissu fibreux ou conjonctif par biopsies musculaires. Finalement, il observa que l'hydrothérapie et des massages accompagnés des stimulations électriques pouvaient améliorer la condition des patients pendant les phases initiales du développement de la maladie. C'est ainsi que ses travaux plus poussés lui ont valu l'attribution de son nom à cette myopathie.

En 1886, Gowers (William Richard Gowers, 1845-1915) observa que les cas isolés de dystrophie étaient plus rares que les cas familiaux avec des antécédents du côté de la mère. Il observa même qu'une femme pouvait avoir des enfants dystrophiques dont les pères étaient différents. Il décrivit aussi la manière que ces enfants, les plus faibles entre

autres, se levaient d'une position couchée jusqu'à se mettre debout (Figure 2.1) (Gowers 1886). Son nom a été attribué à cette manœuvre.

L'Allemagne s'intéressait aussi aux dystrophies musculaires et les travaux de Wilhem Heinrich Erb (1840-1921) sont dignes de mention. Il fut le premier à tenter une classification des différentes dystrophies (Engel et al. 1994).

2.2 La pathologie

Le caractère pathologique de cette myopathie se traduit par une dégénérescence progressive du tissu musculaire. Durant la première année de vie, les bébés ne présentent pas de symptômes évidents, mis à part un léger retard de croissance. Durant leur tendre enfance, les malades ne présentent que rarement des symptômes, même si certains signes cliniques démontrent que le processus dégénératif est déjà amorcé (haut taux de créatine kinase (CK) sérique et nécrose des fibres musculaires (Arikawa et al. 1991; Prella et al. 1992). Les premiers signes se traduisent par une stature plus courte, une difficulté à courir ou à monter les escaliers, des chutes fréquentes et un élargissement des muscles des mollets (Firth et al. 1983; Eiholzer et al. 1988). Les signes de Gowers (Figure 2.1) ainsi que la démarche chancelante apparaissent vers l'âge de 3 à 6 ans. La dégénérescence affecte les muscles proximaux, plus que les muscles distaux, ainsi que les muscles des membres inférieurs et dorsaux, plus que les muscles des membres supérieurs. La régression de la force musculaire est constante et presque de manière linéaire entre l'âge de 6 et 11 ans (Allsop et al. 1981; Cohen, L. et al. 1982), avec une prépondérance pour les muscles proximaux (Gardner-Medwin 1980). En effet, les biceps et triceps sont plus affectés que les deltoïdes, les extenseurs du poignet plus que les fléchisseurs et les tibials antérieurs, les péronés plus que les gastrocnémiens, soleus et tibials postérieurs.

Lors d'une étude sur un grand nombre de patients, 94% de ceux-ci pouvaient monter les escaliers avec une difficulté légère à l'âge de 8 ans et moins. Par contre, à l'âge de 10 ans, seulement 14 % étaient encore capables d'effectuer ce même exercice avec la même difficulté (Brooke et al. 1981). C'est durant cette période que les enfants perdent leur faculté ambulatoire autonome. Ainsi les muscles des membres et du torse perdent de leur masse. Leurs activités se limitent alors à l'emploi des avant-bras et des doigts. Le décès

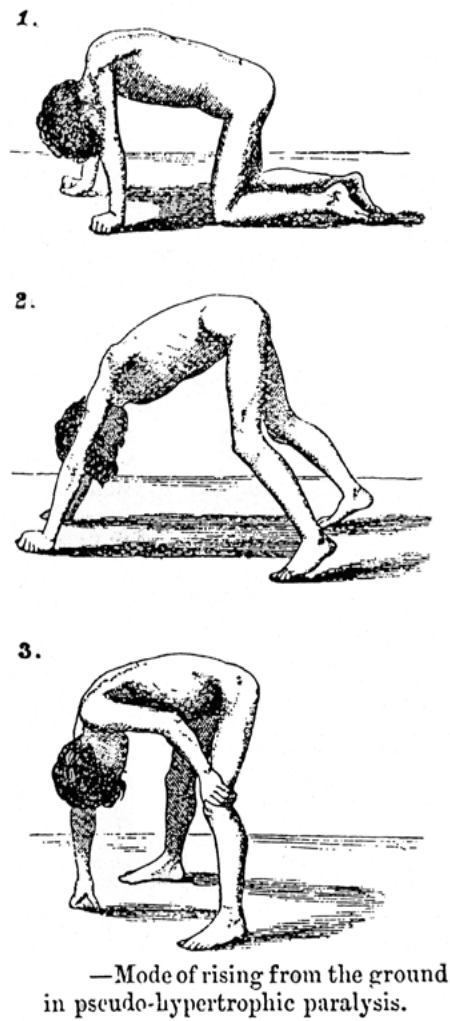


Figure 2.1: Dessins de Gower d'un enfant atteint de dystrophie musculaire se levant du sol.

(Engel et al. 1994)

des patients, causé par l'affaiblissement des muscles respiratoires, survient par rétention du monoxyde de carbone et anoxémie (diminution de la quantité d'oxygène sanguin) accompagnées d'une infection respiratoire. Les décès par défaillance cardiaque surviennent dans 10 à 40% des cas (Mukoyama et al. 1987). L'âge du décès varie entre 10 et 29 ans avec une moyenne de $18,3 \pm 3,6$ ans.

Cette maladie, la plus sévère des dystrophies musculaires, affecte principalement les garçons à une incidence de 1/3500 nouveau-nés mâles (Emery, Alan E. H. 1993). Les femmes porteuses sont généralement asymptomatiques sauf dans les cas de syndromes de Turner (XO) ou de Turner mosaïque (X/XX ou X/XX/XXX), un chromosome X ayant une structure anormale ou une translocation autosomale du chromosome X (Lindenbaum et al. 1979; Greenstein et al. 1980; Jacobs et al. 1981; Zatz et al. 1981). Il peut aussi survenir une inactivation du chromosome X normal, ce qui entraîne l'expression de la dystrophine mutée codée sur l'autre chromosome X (Gomez et al. 1977). Le tiers des nouveaux cas reportés est attribuable à une nouvelle mutation dans le gène de la dystrophine, soit environ 1 cas sur 10 000 (Gardner-Medwin 1970; Emery, A. E. 1980; Moser 1984).

2.3 La cause génétique

Le gène causant la dystrophie musculaire de Duchenne a été identifié en 1986 (Monaco et al. 1986) et son produit, la dystrophine, a été caractérisé par le groupe de Kunkel en 1987 (Hoffman et al. 1987). Le gène est localisé sur le chromosome X au locus Xp21, ce qui en fait une maladie récessive liée au chromosome X. La dystrophine est exprimée par différents types cellulaires dans lesquels plusieurs isoformes sont retrouvées. Les mutations à l'intérieur du gène, qui produisent une dystrophine tronquée, se traduisent phénotypiquement par le développement d'une dystrophie. Cette maladie est donc héréditaire et affecte majoritairement les garçons.

Le gène de la dystrophine est parmi les plus grands connus, contenant 2,4 mégabases d'ADN (acide désoxyribonucléique), ce qui comprend environ 1% du chromosome X. La partie codante (environ 14 kilobases) renferme 79 exons séparés par des introns pouvant atteindre 200 kilobases (Kb) (Koenig et al. 1987). Seulement 0,6% du gène code pour la protéine dystrophine.

2.4 La dystrophine

La dystrophine possède un poids moléculaire approximatif de 427 kDa (kilo Daltons). Elle est retrouvée dans les muscles, le cortex, la rétine et les cellules de Purkinje (Ahn et al. 1993). La dystrophine se localise sous le sarcoplasme des fibres musculaires squelettiques avec une expression accrue aux jonctions neuromusculaires et aux jonctions myotendineuses (Arahata et al. 1988; Bonilla et al. 1988; Zubrzycka-Gaarn et al. 1988; Carpenter et al. 1990; Byers et al. 1991; Zubrzycka-Gaarn et al. 1991). Les myoblastes n'expriment pas la dystrophine, mais lorsque les cellules se différencient, elles fusionnent et la dystrophine est détectable dans les myotubes (Lev et al. 1987; Nudel et al. 1988; Klamut et al. 1989; Barnea et al. 1990). La dystrophine est exprimée dans tous les tissus musculaires, incluant le cœur et les tissus musculaires lisses (Nicholson et al. 1989; Byers et al. 1991; Yarom et al. 1992; North et al. 1993). D'autres isoformes (Dp71, Dp116, Dp140 et Dp260), induites par des promoteurs différents, sont retrouvées dans différents tissus. Ces isoformes ont été détectées dans certaines parties du cortex cérébral (Nudel et al. 1989; Barnea et al. 1990; Boyce et al. 1991), dans les cellules de Purkinje (Gorecki et al. 1992), dans les cellules gliales (Bar et al. 1990; Gorecki et al. 1992; Hugnot et al. 1992; Lederfein et al. 1992; Rapaport et al. 1992), dans les cellules de Schwann (Byers et al. 1993), et dans plusieurs organes (rein, rétine, foie, poumon, cœur, pancréas et testicule) (Ahn et al. 1993; Durbeej et al. 1997; Muntoni et al. 2003). Plusieurs isoformes se retrouvent dans un même type cellulaire ou tissulaire, mais l'isoforme Dp71 est retrouvé dans la plupart des tissus, sauf dans les muscles squelettiques (Ahn et al. 1993).

La séquence de la dystrophine est relativement bien conservée entre les espèces (humains, rongeurs et poulets), particulièrement la partie 3' (Lemaire et al. 1988). L'analyse des acides aminés suppose une protéine de forme allongée entrant dans la composition du cytosquelette (Koenig et al. 1988). La dystrophine peut être divisée en quatre parties :

- 1- Les premiers 240 acides aminés possèdent une homologie de séquence au domaine de liaison de l' α -actinine (Hammonds 1987) et se lient à l'actine (Levine et al. 1990; Hemmings et al. 1992; Way et al. 1992).

- 2- Le plus gros fragment suit celui de la liaison à l'actine et comprend 2400 acides aminés. Sa séquence prédit une forme allongée et consiste en 25 (Cross et al. 1990) ou 26 (Koenig et al. 1988) séquences répétées en forme de triple hélices ressemblant à la spectrine.
- 3- Le troisième domaine comprend 280 acides aminés contenant 15 cystéines et une série de 142 acides aminés ayant une homologie de 24% avec l'extrémité carboxy-terminale de l' α -actinine (Koenig et al. 1988).
- 4- La partie carboxy-terminale de la dystrophine est formée d'au moins 420 acides aminés. La section riche en cystéines (troisième domaine) et l'extrémité proximale sont essentielles pour la liaison de la dystrophine à son complexe associé (Bies et al. 1992; Suzuki et al. 1992; Ervasti et al. 1993; Matsumura et al. 1993; Jung et al. 1995). Ce domaine possède aussi une homologie significative à l'utrophine, une protéine encodée sur le chromosome 6 et qui est de la même famille que la dystrophine (Love et al. 1989; Love et al. 1993).

2.4.1 Les mutations

Plusieurs types de mutations surviennent à l'intérieur du gène de la dystrophine: soit des réarrangements de larges sections d'ADN (délétions ou duplications), soit des mutations impliquant un nombre faible de nucléotides (mutations ponctuelles ou microdélétions).

Les réarrangements importants sont retrouvés dans environ 60 à 65% des cas de DMD (Koenig et al. 1987; Baumbach et al. 1989; Battaloglu et al. 1992; Covone et al. 1992; Niemann-Seyde et al. 1992; Simard et al. 1992; Specht et al. 1992; Bushby et al. 1993). Les duplications partielles surviennent dans 6% des mutations en Amérique du Nord (Hu et al. 1990), mais ce chiffre passe à 14% des cas au Japon (Hiraishi et al. 1992). Certaines régions du gène sont plus sensibles aux mutations et sont situées là où les introns sont particulièrement longs (entre les premiers 20 exons du gène), à l'intérieur du plus large intron et entre les exons 44 et 45 (Koenig et al. 1987; Den Dunnen et al. 1989; Koenig et al. 1989). Ces réarrangements importants sont généralement de longueurs inégales.

Dans le cas des petites mutations, elles apparaissent dans 30% des cas de DMD (Bulman et al. 1991; Kilimann et al. 1992; Roberts et al. 1992; Bushby et al. 1993) dont 3 types ont été identifiés jusqu'à présent : des mutations ponctuelles, une délétion d'un nucléotide (Prior et al. 1993) et une délétion de 32 paires de bases (Matsuo et al. 1991). La plupart de ces mutations provoquent un changement du cadre de lecture produisant une protéine non-fonctionnelle.

Il n'y a pas de corrélation entre la taille de la mutation et la sévérité de la maladie (Monaco et al. 1988). Certaines mutations dans le gène de la dystrophine ne modifient pas le cadre de lecture mais donnent quand même un phénotype DMD. Si ces mutations (surtout des délétions) modifient la protéine en ses parties riches en cystéine et en son domaine carboxy-terminal, il n'y aura plus de liaison de la dystrophine à son complexe associé (Bies et al. 1992; Matsumura et al. 1993).

Par contre, certaines modifications du gène de la dystrophine peuvent causer un phénotype atténué. Par exemple, la dystrophie musculaire de Becker se caractérise par des symptômes beaucoup moins sévères, une progression plus lente et une nécrose musculaire moins importante que la DMD (Mostacciuolo et al. 1987). Chez ces patients, les mutations sont plutôt des délétions ou des duplications qui n'affectent pas le cadre de lecture, et surviennent dans des régions qui ne sont pas impliquées dans l'interaction avec les autres membres du complexe glycoprotéinique de la dystrophine. La protéine dystrophine conserve donc une certaine fonctionnalité.

2.4.2 Complexe glycoprotéique associé à la dystrophine

Plusieurs autres protéines associées à la dystrophine forment un complexe liant les filaments d'actine (filaments fins) avec la matrice extracellulaire, en traversant le sarcolemme (Ehmsen et al. 2002). À ce jour, le complexe associé à la dystrophine (CAD) compte 18 protéines : la laminine- $\alpha 2$ (mérosine), les dystroglycans (α, β), les sarcoglycans ($\alpha, \beta, \delta, \epsilon, \gamma$), la sarcospan, la dystrobrevine, les syntrophines ($\alpha 1, \beta 1$ et $\beta 2$), la "nitric oxyde synthase" (NOs), la MAST205 ("microtubule associated serine/threonine kinase 205 Kd"), la syncoiline, la calvéoline-3 et la Grb2 (Figure 2.2). Ce lien serré entre la dystrophine et son complexe permet de relier les myofibrilles au sarcolemme et la matrice

extracellulaire. Dans le cas de la DMD, les protéines du CAD ne se localisent pas au sarcolemme, dû à l'absence de dystrophine (Ervasti et al. 1990; Ohlendieck et al. 1993). Cette observation se produit aussi chez les souris *mdx*, le modèle animal de souris de DMD (Ervasti et al. 1990; Ohlendieck et al. 1991). De plus, des modifications dans les gènes de certaines protéines du CAD se traduisent en myopathie.

La laminine- $\alpha 2$ se situe entre le sarcolemme et la matrice extracellulaire. Son absence provoque une dystrophie musculaire congénitale. Cette protéine est constituée de 3 hétérodimères : les chaînes α, β et γ (Leivo et al. 1988; Ehrig et al. 1990). La laminine est reliée aux dystroglycans.

Les dystroglycans comprennent deux protéines, une de 156 Kda (α -dystroglycan) et l'autre de 43 Kda (β -dystroglycan) (Ervasti et al. 1990). L'unité alpha se situe à l'extérieur du sarcolemme et permet la liaison avec la laminine; tandis que l'unité bêta se lie avec la dystrophine en traversant la membrane plasmique (Suzuki et al. 1994; Smalheiser et al. 1995). L'interaction directe entre la dystrophine et ces protéines a permis l'usage du préfixe « dystro » et le terme « glycan » provient de leur nature hautement glycosylée (Ibraghimov-Beskrovnaya et al. 1992). À cause de leur expression ubiquiste, une mutation causant une disparition complète des dystroglycans pourrait être létale (Jung et al. 1995). Par contre, certaines mutations peuvent causer une dystrophie des ceintures (une dystrophie adulte qui affecte seulement les muscles des hanches et des épaules) (Salih et al. 1996).

Six autres protéines se retrouvent au niveau du sarcolemme dont les sarcoglycans et la sarcospan. Le complexe des sarcoglycans est composé des sous unités α (50 kDa), β (43 kDa), δ (35 kDa), ε (50 kDa) et γ (35 kDa). Ce complexe est joint aux dystroglycans par association latérale, mais les sites de liaisons exacts restent encore à définir (Suzuki et al. 1994; Ozawa et al. 1995). Une déficience en l' α -sarcoglycan est associée à une dystrophie musculaire autosomale récessive de l'enfance (Matsumura et al. 1992), dont les symptômes ressemblent à ceux de la DMD (Ben Hamida et al. 1983), et aussi à la dystrophie des ceintures de type 2D. Les autres sarcoglycans sont reliés à certains types de dystrophie des ceintures : type 2E (β -sarcoglycan), type 2C (γ -sarcoglycan) et le type 2F (δ sarcoglycan) (Straub et al. 1997; Ozawa et al. 1998). La sarcospan est une protéine de 25 kDa, qui

traverse quatre fois la membrane sarcoplasmique, et qui contient une large partie extracellulaire (Crosbie et al. 1997).

Au niveau du cytoplasme, sous la membrane plasmique, on retrouve les syntrophines, l' α -dystrobrevine, la MAST et finalement la NO synthase de type neuronal (nNOs). Les syntrophines (α , $\beta 1$ et $\beta 2$) possèdent toutes un poids moléculaire de 58 kDa, mais des points isoélectriques différents, permettant leur séparation sur gel d'électrophorèse en deux dimensions (Yamamoto et al. 1993; Ahn et al. 1996). Les trois formes des syntrophines se lient avec la dystrophine *in vitro* et leur expression est diminuée en absence de dystrophine (Peters et al. 1994; Tachi et al. 1997). L' α -syntrophine se co-localise avec la NOs par microscopie électronique avec marquage à l'or colloïdal, ce qui indique une interaction possible entre ces deux protéines (Wakayama et al. 1997). La nNOs est exprimée dans plusieurs types cellulaires dont les neurones, les muscles squelettiques, les cellules épithéliales et les cellules de la *macula densa* (Grozdanovic et al. 1999). Cette enzyme est retrouvée en plus grande quantité à la membrane des fibres de type II et son produit, l'oxyde nitrique, sert de messager modulant la force contractile (Kobzik et al. 1994). Lors de l'absence de dystrophine, la nNOs se localise anormalement dans le cytoplasme et continue de produire de l'oxyde nitrique, ce qui pourrait contribuer à la pathologie chez les patients DMD.

L' α -dystrobrevine est une protéine homologue à la dystrophine. Elle co-précipite avec le récepteur de l'acétylcholine et avec le complexe associé à la dystrophine (Blake et al. 1996; Sadoulet-Puccio et al. 1997). Cette protéine est liée à la dystrophine par des structures hélicoïdales répétées (Suzuki et al. 1995) et aux syntrophines par des sites de liaison aux syntrophines (Peters et al. 1997). La dystrobrevine est grandement réduite chez les patients DMD et chez certaines dystrophies des ceintures reliées aux sarcoglycans (Metzinger et al. 1997; Puca et al. 1998).

La MAST205 a été récemment associée au complexe de la dystrophine par le groupe de Chamberlain (Lumeng et al. 1999). Ces études démontrent que la MAST205 permet le lien du complexe de la dystrophine aux microtubules. Ce lien s'effectue par des domaines d'interaction PDZ entre la MAST205 et les syntrophines.

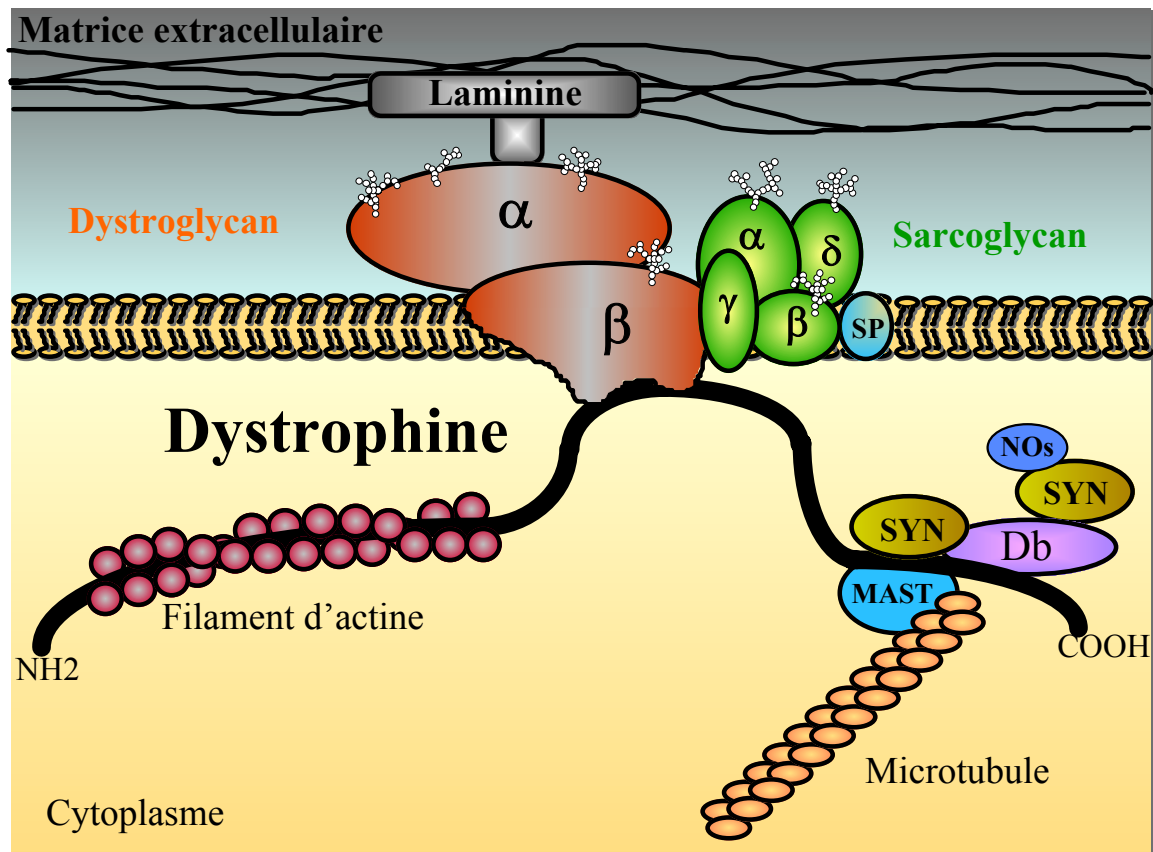


Figure 2.2: Schéma du complexe glycoprotéique associé à la dystrophine.

SP : Sarcospan, SYN : Syntrophine, Db : Dystrobrevine, NOs : « Nitric oxyde synthase », MAST : « Microtubule-associated serine/threonin kinase ».

Geoffrey Camirand, inspiré de (Straub et al. 1997)

La syncoiline a été identifiée initialement par son interaction avec l' α -dystrobrevine (Newey et al. 2001). Cette protéine est fortement exprimée au sarcolemme, aux stries Z et aux jonctions neuromusculaires des muscles squelettiques, cardiaques et lisses. Son expression accrue dans certaines dystrophies peut être due à un mécanisme compensatoire, puisqu'elle interagit avec la desmine, ce qui suppose un lien entre le CAD et le réseau de filaments intermédiaires (Poon et al. 2002).

Finalement, la calvéoline-3 interagit avec la partie C-terminale de la β -dystroglycan, co-précipite avec la dystrophine et l' α -sarcoglycan. La calvéoline-3 est aussi surexprimée chez les DMD. Cette protéine a pour fonction de créer des invaginations vésiculaires de la membrane plasmique dans la plupart des cellules. Par contre son rôle au niveau du CAD reste encore à éclaircir (Galbiati et al. 2001). La Grb2 possède des domaines SH2 et SH3 (« Src homology domains »), interagissant avec des protéines importantes dans la transduction de signaux intracellulaires (Schlaepfer et al. 1994). Grb2 lie les domaines riches en proline de la β -dystroglycan par ses domaines SH3 (Yang, B. et al. 1995).

2.4.3 Rôles du complexe associé à la dystrophine

Tout le complexe associé à la dystrophine semble jouer plusieurs rôles dans la pathologie de la DMD et autres myopathies. Même si un grand nombre de ses composantes ont été identifiées, il n'est pas possible pour l'instant de déterminer un rôle précis pour chacune d'entre elles. Par contre, ces découvertes permettent de discerner de nouvelles théories attenantes aux rôles « mécano-signalétiques » que peut jouer le complexe au niveau du tissu musculaire.

Depuis plusieurs années, même avant la découverte de la dystrophine, les chercheurs observaient une augmentation de la nécrose des fibres musculaires chez les patients DMD (Rowland 1980) et attribuaient cette nécrose à un manque du maintien de l'intégrité des membranes des fibres. Lors de la découverte de la dystrophine et de son association avec le sarcolemme, la notion de protection de la fibre musculaire aux dommages engendrés par des cycles répétés de contraction et de relaxation s'est alors accentuée. Cette fragilité

membranaire, attribuable à l'absence du complexe et de la dystrophine, affecte la perméabilité des fibres, ce qui provoque l'entrée massive d'ions calciques provenant du liquide extracellulaire. Cette entrée massive d'ions cause une réduction de la synthèse d'ATP par les mitochondries (Wrogemann et al. 1976), une activation des protéases neutres qui peuvent digérer les protéines des myofibrilles et du cytosquelette (Kar et al. 1978), une augmentation de la dégradation des protéines médiée par la prostaglandine E₂ (Rodemann et al. 1982) et une dissolution de la membrane de phospholipides engendrée par une activation des phospholipases (Wong et al. 1979; Farber 1982; Jackson, M. J. et al. 1984; Jones, D. A. et al. 1984; Jackson, M. J. et al. 1985). Tous ces événements peuvent amplifier le défaut membranaire et générer ainsi une cascade d'événements permettant une entrée encore plus importante de liquides extracellulaires.

En plus d'une grande proportion de fibres nécrotiques dans les muscles de patients DMD, plusieurs autres observations appuient l'hypothèse de la fragilité membranaire à cause de l'absence de la dystrophine et de son complexe. En effet, l'examen des fibres musculaires anormales à l'aide de la microscopie électronique démontre des brèches au sarcolemme de fibres non-nécrotiques n'ayant aucune autre anomalie structurale, ce qui représente un signe précoce d'un bris des fibres musculaires (Mokri et al. 1975). De plus, on observe un relargage anormal de créatine kinase et de myoglobine du sarcoplasme au sérum lorsque le patient est au repos. Ce relargage est rapidement augmenté lorsque le patient effectue un exercice modeste (Florence et al. 1985). Les muscles les plus atteints sont les muscles qui doivent déplacer les charges les plus lourdes. Ainsi, les muscles demandant peu de force, par exemple ceux permettant le mouvement des yeux, sont épargnés parce qu'ils ne subissent que de faibles stress mécaniques (Kaminski et al. 1992). De plus, les fibres musculaires à contraction rapide (Type II), qui sont sujettes à de grands stress mécaniques, sont sélectivement vulnérables chez les patients DMD.

2.5 Les modèles animaux

Il existe trois modèles animaux spontanés caractérisés par une absence d'expression de dystrophine dans les fibres musculaires : la souris *mdx*, la dystrophie musculaire canine et féline.

2.5.1 La souris *mdx*

La souris *mdx* possède une mutation (transversion d'un nucléotide C pour un T) à la position 3185, ce qui converti le codon glutamine CAA en un codon d'arrêt TAA (Sicinski et al. 1989). Cette mutation s'est produite chez la souche de souris congénitale C57BL/10ScSn. Le produit du gène muté de la dystrophine est tronqué et ne possède pas la capacité fonctionnelle de s'attacher au sarcolemme. De plus, comme chez les patients DMD, il en résulte une absence marquée du complexe glycoprotéique associé à la dystrophine (Ohlendieck et al. 1991).

Par contre, les souris *mdx*, comparées aux humains, ne présentent que peu de phénotypes associés à la maladie et elles ont la capacité de se reproduire. On observe peu de fibres musculaires en nécrose et elles sont continuellement remplacées par des fibres régénératrices au lieu du tissu conjonctif. Toutes les fibres musculaires des souris *mdx* ont leurs noyaux localisés au centre de la fibre, même lorsque celles-ci ont atteint leur maturité. Les fibres de type II sont préférentiellement remplacées par des fibres de type I, comme chez les patients DMD (Wong et al. 1979; Jackson, M. J. et al. 1984).

Les causes menant à un phénotype adouci, malgré l'absence de dystrophine chez la souris *mdx*, ne sont pas encore comprises. Les explications possibles englobent plusieurs hypothèses: un potentiel régénératif élevé des cellules satellites de souris (Grounds et al. 1992), ces cellules satellites sont stimulées par l'hormone de croissance des fibroblastes (FGF, "fibroblast growth factor"); une suppression de la protéolyse calcium dépendante (DiMario et al. 1989); ou encore que les fibres musculaires des souris n'ont pas à subir de stress mécaniques aussi imposants que chez les humains et les chiens.

La souris *mdx* a été utile lors de recherches pour expliquer les mécanismes de bris des fibres musculaires et pour évaluer différentes approches thérapeutiques à l'absence de dystrophine; tout ceci sera décrit dans la section 2.6 suivante.

Une autre souche de souris *mdx* a été produite par mutagenèse chimique pour inactiver le gène de la dystrophine. La souris *mdx*^{3Cv} n'exprime pas les isoformes de 427 kDa et de 70 kDa de la dystrophine. La différence entre la *mdx*^{3Cv} et la *mdx* est que très peu

de nouveau-nés par portée de *mdx*^{3Cv} survivent. Le développement de la maladie s'effectue de la même manière que chez la souris *mdx* (Cox et al. 1993).

2.5.2 Dystrophie musculaire canine

L'absence de dystrophine chez les chiens cause une myopathie et cardiomyopathie similaire aux patients DMD (Valentine et al. 1992). La maladie a été observée chez les golden retrievers, les terriers irlandais, les samoyèdes et les rottweillers. On observe des taux de CK élevés qui sont augmentés par l'exercice. Les chiens dystrophiques ont une stature raide avançant à petits pas, une démarche chambranlante, une difficulté à ouvrir la mâchoire et à se nourrir. Ils salivent aussi excessivement à cause de l'épaississement de la base de leur langue. Au niveau histologique, les fibres nécrosées sont graduellement remplacées par du tissu fibreux causant une atrophie. Seule la partie amino-terminale de la dystrophine canine peut être détectée à l'aide d'anticorps chez les chiens atteints de la maladie. La mutation est causée par un changement d'une base A pour G à l'intérieur d'un site d'épissage consensus situé à l'extrémité 3' de l'intron 6, ce qui résulte en une protéine manquant les exons 6 à 8.

2.5.3 Dystrophie musculaire féline

Les dystrophies chez les chats sont plus rares et les symptômes sont observés durant leur première ou leur deuxième année de vie. Les chats malades présentent un élargissement musculaire, une langue proéminente, une mobilité affectée et des signes de cardiomyopathie. Sur des coupes de muscles, on observe des amas de fibres musculaires nécrotiques et un faible marquage pour la dystrophine (Gaschen et al. 1992). Le site de mutation n'a pas été identifié à ce jour.

2.6 Les thérapies

Les travaux de recherche à ce jour n'ont pu développer une thérapie permettant l'arrêt de l'évolution de la dystrophie musculaire de Duchenne. Parmi les avenues possibles, on dénote l'utilisation de différentes médications, la thérapie génique et la thérapie cellulaire.

2.6.1 La thérapie par médication

Parmi les agents inefficaces à améliorer l'état des patients DMD, démontrés par des essais cliniques bien contrôlés, on dénote l'utilisation de bloqueurs des canaux calciques comme : verapamil , flunarizine, nifedipine et diltiazem (Dick et al. 1986; Moxley et al. 1987; Pernice et al. 1988). L'insuccès des essais utilisant ces drogues n'est pas surprenant, puisque l'influx de calcium à l'intérieur des fibres musculaires est aussi causé par des défaillances au niveau du sarcolemme, ce que le blocage des canaux calciques ne peut prévenir. Un résultat peu significatif a été obtenu avec le dantrolène qui a permis de réduire le taux de CK et qui a démontré un effet bénéfique faible sur la perte de force musculaire chez des patients DMD (Bertorini et al. 1991).

Par contre, la prednisone a démontré un effet bénéfique pour les malades DMD lors d'études conduites entre 1989 et 1993 (Mendell et al. 1989; Fenichel et al. 1991a; Fenichel et al. 1991b). Après trois ans de traitement, les patients ont démontré un ralentissement significatif de la progression de la maladie ainsi qu'une augmentation de leur masse musculaire. Il a été initialement supposé que l'effet anti-inflammatoire de la prednisone serait responsable de l'effet bénéfique observé, mais l'utilisation d'un autre anti-inflammatoire/immunosuppresseur, l'azathioprine, n'a pas démontré les mêmes résultats (Fenichel et al. 1991a). Ainsi, le mécanisme engendrant l'effet positif du traitement à la prednisone reste encore inconnu. Récemment, une étude menée en double aveugle a permis de démontrer que l'utilisation du déflazacort, chez des patients atteints de DMD, maintient les fonctions motrices au même niveau que l'utilisation de la prednisone. De plus, l'utilisation du déflazacort chez ces patients a démontré des effets secondaires moindres que la prednisone (Bonifati et al. 2000).

2.6.2 La thérapie génique

La thérapie génique consiste à introduire un ou plusieurs gènes d'intérêt à l'intérieur des cellules d'un organisme en utilisant différents vecteurs. Dans le cas de la dystrophie musculaire, le gène d'intérêt est celui de la dystrophine normale (fonctionnelle), et le but thérapeutique est de faire exprimer cette protéine à l'intérieur des fibres musculaires. De manière générale deux types de thérapie génique ont été tentés *in vivo* : l'injection

intramusculaire de plasmides et l'utilisation de vecteurs viraux. Les principaux obstacles que doit surmonter la thérapie génique comme approche thérapeutique à la dystrophie musculaire sont: la capacité des vecteurs à contenir un large gène, l'introduction de leur matériel génétique à l'intérieur d'un grand nombre de fibres musculaires post-mitotiques, la persistance de l'expression du gène introduit et leur capacité à échapper au système immunitaire.

L'injection de plasmides contenant le gène de la dystrophine n'a permis d'observer l'expression de la dystrophine que dans 1% des fibres musculaires (Acsadi et al. 1991). Plus récemment, l'électrotransfert de plasmides, contenant un gène rapporteur, à l'intérieur des muscles de souris *mdx*, a permis d'obtenir une expression atteignant 40% des fibres (Vilquin et al. 2001). Cette expression a été prolongée à plus de 10 semaines sous une immunosuppression transitoire ou soutenue, comparée à une expression de 3 semaines sans immunosuppression. Dans cette même étude, un plasmide de grande taille contenant le gène de la dystrophine en fusion avec le gène de l'eGFP ("enhanced green fluorescent protein") a été électrotransféré à l'intérieur de muscles de souris *mdx*. Cette technique nécessite par contre des injections répétées de plasmides pour une expression à très long terme et est limitée par son accès à certains muscles.

L'utilisation de vecteurs viraux défectifs pour leur répllication est plus prometteuse. L'emploi de l'adénovirus a permis l'introduction du gène de la mini-dystrophine (dystrophine tronquée ayant les parties C et N terminales intactes) à l'intérieur de 50% des fibres musculaires 15 jours après l'injection du virus (Ragot et al. 1993). Par contre, l'expression de la mini-dystrophine a été grandement diminuée six mois suivant l'injection. Les adénovirus de première et de deuxième génération ne peuvent se répliquer, mais contiennent des gènes viraux, ce qui les rend très immunogéniques et limite leur capacité d'encapsulation.

Avec le développement de techniques pouvant générer des vecteurs adénoviraux ne contenant aucun gène viral ("guttéted adenoviral vectors"), divers avantages se sont ajoutés à leur utilisation. Ces vecteurs ne peuvent générer de réponses immunes causées par des gènes viraux et ils permettent l'encapsulation d'un transgène de grande taille (variant entre 28 à 30 Kb). L'utilisation d'un adénovirus "guttéted" contenant la partie codante complète de

la dystrophine et le gène de la β -galactosidase a permis l'expression génique jusqu'à un an dans les muscles de souris immunodéficientes SCID/*mdx*. L'efficacité de cette expression était comparable à celle obtenue à l'aide d'adénovirus de première génération (Hartigan-O'Connor et al. 2000). Par contre, l'utilisation de l'adénovirus est limitée par son efficacité restreinte aux jeunes souris, causé par l'expression d'un récepteur exprimé seulement pendant la croissance. De plus, l'absence d'intégration du gène à l'intérieur du génome de la cellule cible ne permet pas une expression à très long terme.

L'approche ayant donné les résultats les plus intéressants est l'utilisation du vecteur viral adéno-associé (AAV). Ce vecteur ne contient aucun gène viral et est capable de s'intégrer au génome de l'hôte. Par contre, sa capacité d'encapsidation limitée (5 Kb) ne permet que l'utilisation du gène de la mini-dystrophine comme traitement de la DMD. Une expression de la mini-dystrophine, bien localisée sous la membrane basale de fibres musculaires, a été détectée six mois après injection de AAV dans des muscles de souris *mdx* (Wang, B. et al. 2000). De plus, ces résultats ne dépendent pas de l'âge de l'hôte et l'expression de la mini-dystrophine a permis la restauration du complexe protéique associé à la dystrophine.

2.6.3 La thérapie cellulaire

2.6.3.1 Transplantation de myoblastes normaux

L'injection de myoblastes dans les muscles de patients DMD ou des souris *mdx*, comme thérapie pour la dystrophie musculaire, est basée sur la capacité de ces cellules à fusionner avec les fibres musculaires de l'hôte, transférant ainsi leur noyau contenant le gène normal de la dystrophine (Figure 2.3). La dystrophine et ses protéines associées sont alors exprimées au sarcolemme dans ces fibres (Karpati et al. 1989; Partridge et al. 1989). Cette approche est la plus prometteuse pour le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne. Par contre, la transplantation de myoblastes ne s'effectue pas sans obstacles :

- 1- Le rejet spécifique par le système immunitaire des myoblastes transplantés doit être contrôlé par des immunosuppresseurs (Guerette et al. 1995a).

- 2- Entre 70-80% des myoblastes injectés meurent dans les 72 premières heures après la greffe (Guerette et al. 1997a; Guerette et al. 1997b; Merly et al. 1998). Le taux de mortalité atteint 99% selon Beauchamp et al. (Beauchamp et al. 1999), ce qui nécessite l'injection d'une grande quantité de cellules.
- 3- La faible migration des myoblastes à l'intérieur du muscle nécessite des injections multiples avec des trajectoires très rapprochées.

2.6.3.2 Les essais cliniques précoces de transplantation de myoblastes

Les essais cliniques effectués au début des années 1990, suite aux résultats chez les souris, n'ont pas donné les résultats escomptés (Gussoni et al. 1992; Huard et al. 1992; Karpati et al. 1993; Tremblay et al. 1993; Mendell et al. 1995). Peu d'importance a été accordé au cours de ces premiers essais cliniques au contrôle de la réponse immune à cause de la croyance, désormais démontrée fausse, que les fibres musculaires ainsi que les myoblastes n'expriment pas les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Skuk et al. 2000b). Les patients ont été soit immunosupprimés avec la cyclosporine A ou la cyclophosphamide, ou non-immunosupprimés. Les meilleurs résultats lors des essais cliniques précoces ont démontré la présence de 10% de fibres dystrophine positives dans un muscle préalablement injecté de myoblastes. Ces fibres positives ont été détectées à l'aide d'un anticorps dirigé contre un épitope de la dystrophine, absent chez le patient, pour éviter la détection de fibres révertantes (i.e. que la mutation causant la dystrophine non-fonctionnelle a été esquivée) (Mendell et al. 1995). On a dénoté aussi une faible augmentation transitoire de la force musculaire chez quelques patients dans une seule étude (Huard et al. 1992). Une seule des études de transplantation de myoblastes conduites chez des patients DMD a rapporté un mérite thérapeutique à cette procédure (Law et al. 1992). Par contre, cette étude n'a pas été conduite avec des contrôles adéquats: par exemple, elle ne discerne pas la présence de dystrophine provenant du donneur et des fibres révertantes, ce qui laisse ces résultats dans la controverse.

Suite aux résultats limités obtenus lors de ces essais précoces, une expérimentation animale abondante a permis d'identifier les problèmes encourus, énumérés plus haut. De plus, les conditions de transplantations de myoblastes animaux donnant de bons résultats sont maintenant très différentes de celles utilisées lors des essais cliniques précoces.

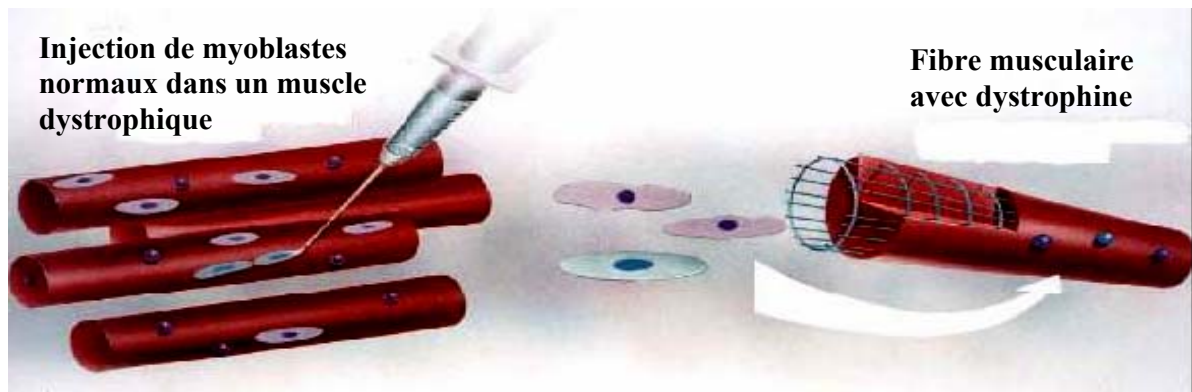


Figure 2.3 : Schéma de la transplantation de myoblastes normaux comme thérapie de la dystrophie musculaire de Duchenne.

Après injection, les cellules fusionnent avec les fibres musculaires de l'hôte et restaurent l'expression de la dystrophine et du CAD sous la membrane plasmique.

(Labrecque et al. 1991)

2.6.3.3 Résultats de l'expérimentation animale de transplantation de myoblastes

L'injection de myoblastes à l'intérieur des muscles de souris a permis de démontrer l'efficacité et l'application de cette thérapie pour la dystrophie musculaire ainsi que pour d'autres pathologies. L'avantage de la transplantation de myoblastes, par rapport aux autres thérapies, est que certaines cellules transplantées se localisent en cellules satellites (accollées aux fibres musculaires), ce qui crée un réservoir de cellules servant à la régénération musculaire lors de bris (Morgan et al. 1993). Par contre, cette thérapie ne permettra pas la guérison complète des patients et seulement les muscles squelettiques importants pourront être injectés.

2.6.3.3.1 Résultats chez la souris

Les résultats de greffe de myoblastes chez la souris *mdx* ont permis de démontrer les limitations de cette technique et aussi comment surmonter ces obstacles. En premier lieu, le rejet cellulaire des myoblastes transplantés est la cause principale des pauvres résultats obtenus chez les patients immunocompétents (Guerette et al. 1995b; Irintchev et al. 1995). Le rejet se caractérise par une infiltration majeure de lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ à l'endroit où les myoblastes allogéniques ont été injectés dans le muscle (Guerette et al. 1995a). Ces lymphocytes infiltrants expriment le récepteur pour l'interleukine 2, l'interféron- γ et l'enzyme Granzyme B, démontrant ainsi leur activation destructrice (Guerette et al. 1995b; Guerette et al. 1996). De plus, l'injection de myoblastes humains à l'intérieur de muscles de souris SCID (« severe combined immunodeficiency », souris sans lymphocytes T et B) a permis la formation de plusieurs fibres musculaires exprimant la dystrophine humaine (Huard et al. 1994a; Huard et al. 1994b; Skuk et al. 1999a). Ces expériences démontrent que le rejet cellulaire est la cause importante de la limitation du succès des transplantations et que la transplantation de myoblastes humains est efficace.

Malgré la compatibilité entre individus au niveau de leurs complexes majeurs d'histocompatibilité, on observe un rejet des myoblastes suite à leur transplantation lorsque les sujets ne sont pas immunosupprimés (Boulanger et al. 1997). Ce rejet implique des antigènes mineurs qui sont des protéines polymorphiques. La dystrophine elle-même est

reconnue par le système immunitaire et active la production d'anticorps chez la souris et chez l'humain (Roy et al. 1993; Vilquin et al. 1995d; Ohtsuka et al. 1998).

Pour contrer ce rejet immunitaire évident, l'emploi d'immunosuppresseurs s'impose et les meilleurs résultats chez la souris ont été obtenus avec le FK506 (Tacrolimus) (Kinoshita et al. 1994). Parmi les immunosuppresseurs étudiés, notons la rapamycine et la cyclosporine A qui ont donné des résultats relativement faibles (Labrecque et al. 1992; Vilquin et al. 1995a), tandis que l'emploi de la cyclophosphamide, une drogue anti-proliférative, a inhibé la division des myoblastes transplantés (Vilquin et al. 1995c). Le problème relié à l'utilisation soutenue d'immunosuppresseurs réside dans les effets secondaires importants causés par ces drogues.

Une stratégie permettant d'éviter le rejet immunitaire et l'emploi d'immunosuppresseurs est la transplantation de myoblastes provenant d'un patient malade et modifiés génétiquement pour exprimer la dystrophine. Ces myoblastes doivent être corrigés en culture *ex vivo* à l'aide de vecteurs viraux ou non-viraux contenant le gène de la dystrophine pour être ensuite réimplantés dans les muscles du patient. Des myoblastes de souris *mdx* ont été modifiés génétiquement à l'aide du vecteur adénovirus, contenant le minigène de la dystrophine et la dystrophine complète humaine, pour être ensuite transplantés avec succès chez la souris *mdx* (Floyd et al. 1998; Moisset et al. 1998). Le minigène de la dystrophine a aussi été introduit, à l'aide de l'adénovirus, à l'intérieur de myoblastes provenant d'un patient DMD, pour être ensuite implantés chez des souris SCID, permettant la formation de fibres musculaires positives pour la dystrophine humaine (Moisset et al. 1998). Ces expériences ont permis de démontrer l'efficacité de la thérapie *ex vivo*. Par contre, les vecteurs adénoviraux provoquent eux-mêmes des réactions immunitaires, ce qui limite leur utilisation pour la thérapie *ex vivo* (Yang, Y. et al. 1994; Vilquin et al. 1995b). De plus, le gène de la dystrophine n'est pas intégré dans le génome des myoblastes et est donc absent de la plupart des myoblastes suivant leur prolifération. Un autre facteur limitant la thérapie *ex vivo* est l'épuisement de la capacité proliférative (sénescence) des myoblastes provenant de patients DMD. La thérapie *ex vivo* nécessite une grande prolifération de ces cellules puisque la transplantation de myoblastes nécessite de grandes quantités pour obtenir l'effet désiré.

La nécessité de l'injection d'une quantité importante de myoblastes réside dans les problèmes de la mort rapide des myoblastes injectés et de leur faible migration du site d'injection. La mort précoce de 70-80% des myoblastes a été observée trois jours après l'injection d'une culture primaire par la méthode de dosage de l'activité β -galactosidase (Guerette et al. 1997a; Guerette et al. 1997b; Merly et al. 1998). Le taux de mortalité d'une lignée de myoblastes, 4 jours suivant leur injection, était de 99%; ceci a été observé par la méthode de dosage de la thymidine radioactive (Beauchamp et al. 1999). Des résultats récents obtenus par Qu et al. (Qu et al. 1998) démontrent qu'une purification d'une culture de myoblastes par la méthode de pré-adhérence permet une meilleure survie des cellules suite à leur transplantation: 55% de mortalité lorsque les cellules ont été pré-adhérées 2 fois, 12% de mort après trois pré-adhérences et un gain de 124% lorsque les cellules ont été pré-adhérées 6 fois. La méthode de pré-adhérence consiste à laisser adhérer les cellules pendant un certain temps pour ensuite transférer les cellules non-adhérentes dans un autre contenant de culture cellulaire. Les temps de pré-adhérence sont 1 heure, 2 heures, 18 heures, 24 heures et ainsi de suite jusqu'à la pré-adhérence 6.

La mort rapide des myoblastes transplantés survient aussi chez les souris SCID et lors de la transplantation de myoblastes autologues, éliminant ainsi l'implication d'un rejet immunitaire spécifique (Guerette et al. 1997b). Les travaux du groupe de Partridge sur la mort des myoblastes ont révélé une petite sous-population de myoblastes ayant des caractéristiques de cellules souches, laquelle serait la seule à survivre après l'injection intramusculaire d'une lignée cellulaire de myoblastes (Beauchamp et al. 1999).

L'inflammation serait responsable de la mort des myoblastes. Les bris causés par les injections à l'intérieur du muscle induisent des réactions inflammatoires. Cet appel inflammatoire engendre l'infiltration des cellules phagocytaires et dégranulantes qui ont pour but de nettoyer ces débris. Puisque les myoblastes injectés se retrouvent en ces lieux de bris tissulaires, ils sont aussi victimes des attaques non-spécifiques de ces cellules nettoyeuses. L'injection d'anticorps anti-LFA-1 ("Leukocyte Function-Associated Antigen One"), qui est une molécule de surface sur les cellules inflammatoires et qui est impliquée dans leur activation, a permis une augmentation de la survie des myoblastes suite à leur injection (Guerette et al. 1997a; Guerette et al. 1997b). L'effet de l'anticorps anti-LFA-1

peut être attribuable au blocage des interactions entre LFA-1 sur les neutrophiles et ICAM-1 ("Intercellular Adhesion Molecule-1") sur les myoblastes, inhibant ainsi le relargage de radicaux d'oxygène et de protéases toxiques par les neutrophiles. On observe aussi une diminution de la mort cellulaire des myoblastes transplantés lorsque l'hôte a préalablement reçu une irradiation pan-corporelle (Guerette et al. 1997b) et lorsque l'hôte est déficient en neutrophiles ou macrophages (Merly et al. 1998). De plus, des myoblastes modifiés génétiquement pour exprimer un inhibiteur de l'IL-1 (Interleukine-1), qui est une cytokine pro-inflammatoire, augmentent leur taux de survie suivant leur transplantation (Qu et al. 1998). Ces expériences démontrent une implication partielle des phénomènes inflammatoires dans la mort des myoblastes, mais les autres causes de ce problème restent encore inconnues.

Un autre obstacle à la transplantation de myoblastes est leur faible migration du site d'injection. Chez la souris, les myoblastes migrent entre $2,6-9,5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ d'un site d'injection 4 jours suivant l'injection (Ito et al. 1998a). Cette capacité migratoire limitée nécessite l'exécution de trajectoires d'injection à environ 1 mm de distance les unes des autres, augmentant ainsi les bris effectués au muscle transplanté. La migration limitée des myoblastes peut être due à leur incapacité à traverser la matrice extracellulaire présente entre les fibres musculaires. Les cellules ayant une grande capacité migratoire, comme les cellules tumorales et les leucocytes, sécrètent des enzymes, appelées métalloprotéinases, qui digèrent cette matrice extracellulaire (Ennis et al. 1994). On peut donc penser que la sécrétion de telles enzymes par les myoblastes augmenterait leur migration à travers la matrice musculaire. Ainsi, la stimulation des myoblastes en culture par la concanavaleine A augmente la sécrétion de métalloprotéinases et améliore leur dispersion à travers le muscle par un facteur 3 suite à leur injection (Ito et al. 1998a). La stimulation par le bFGF ("basic fibroblast growth factor") augmente aussi la sécrétion de métalloprotéinases et a permis de quadrupler le succès de greffe (Kinoshita et al. 1995b). Plus récemment, El Fahime et al. (El Fahime et al. 2000) ont démontré l'importance de MMP2 ("Matrix metalloproteinases 2", gélatinase A, collagénase de type IV de 72-kDa) et son activation par la MT1-MMP ("Membrane type-1 MMP") pour la migration des myoblastes à travers la matrice extracellulaire.

2.6.3.3.2 Résultats de greffe chez le chien

Préalablement à un éventuel essai clinique, l'efficacité des greffes de myoblastes chez des modèles animaux s'approchant le plus de l'humain doit être démontrée. Le modèle dystrophique canin présente des caractéristiques pathologiques et histologiques s'approchant de celles observées chez l'humain (Cooper 1989; Valentine et al. 1992). Les faibles résultats obtenus pour la transplantation de myoblastes chez le modèle canin sont attribuables à l'absence d'immunosuppression (Kornegay et al. 1990) causée par la toxicité élevée du FK506 chez ces animaux, limitant ainsi la dose administrée (Thomson 1990). La combinaison du FK506 à une faible dose, de la cyclosporine A et du mycophénolate mofetil a permis un faible succès de transplantation chez des chiens normaux (Ito et al. 1998b).

2.6.3.3.3 Résultats de greffe chez le singe

Des transplantations de myoblastes ont aussi été effectuées chez un modèle animal plus près de l'humain, soit celui du singe (*Macaca mulatta*). Le singe se rapproche le plus de l'humain au niveau anatomique et immunologique. De très bons résultats ont été obtenus chez ce modèle animal. Le singe ne présente pas autant d'effets secondaires au FK506 que le chien et l'efficacité de cet immunosuppresseur a été démontrée à maintes reprises (Kinoshita et al. 1995a; Kinoshita et al. 1996; Skuk et al. 1999b). Les problèmes rencontrés chez la souris semblent aussi s'appliquer à ce modèle: le rejet immunitaire spécifique, la faible migration des myoblastes et l'importante mort cellulaire (Skuk et al. 1999b). Puisqu'il n'existe pas de modèle singe dystrophique, les myoblastes transplantés sont infectés par un rétrovirus contenant le gène de la β -galactosidase, permettant ainsi de déterminer le succès de la fusion des myoblastes transplantés. Récemment, le groupe du Dr Tremblay a démontré l'expression d'un gène reporteur dans 79% des fibres musculaires de tout un biceps de singe (Skuk et al. 2000a) suite à la transplantation de myoblastes marqués. La présence de fibres musculaires hybrides a été détectée jusqu'à un an post-transplantation. Ces résultats positifs obtenus chez le singe encouragent la reprise des essais cliniques.

2.6.3.4 Autres applications de la transplantation de myoblastes

Le potentiel de la transplantation de myoblastes ne s'arrête pas à la thérapie des myopathies. Certaines pathologies peuvent aussi être traitées ou améliorées par l'injection de cellules musculaires.

Le myocarde, suite à un infarctus, perd de son élasticité et de sa contractilité; ceci est causé par la mort de nombreux cardiomyocytes et leur remplacement par du tissu fibreux. L'injection de cellules musculaires squelettiques dans cette paroi nécrosée a été proposée pour rétablir la contractilité et, ainsi, les fonctions cardiaques (Koh et al. 1993; Van Meter et al. 1995; Murry et al. 1996; Robinson et al. 1996; Taylor, D. A. et al. 1997; Taylor, D. A. et al. 1998). Des résultats encourageants ont été obtenus dans ces études. Récemment, certaines études ont démontré la présence de fibres musculaires squelettiques à l'intérieur du tissu cardiaque cicatrisé, démontrant ainsi la survie et la différenciation des myoblastes (Hagege et al. 2003; Pagani et al. 2003). L'avantage d'une telle approche est la possibilité d'effectuer des autogreffes (donneur et receveur sont le même individu), évitant ainsi les problèmes reliés au rejet immunitaire.

La sécrétion locale ou systémique de différents facteurs ou hormones par des myoblastes a aussi été envisagée. Les myoblastes sont modifiés génétiquement pour sécréter la molécule voulue et sont, par la suite, injectés. Certaines expériences de sécrétion ont été tentées, impliquant le facteur IX, pour traiter l'hémophilie de type B (Roman et al. 1992; Wang, J. M. et al. 1997), l'hormone de croissance (Dhawan et al. 1991), l'érythropoïétine (Hamamori et al. 1994, 1995; Bohl et al. 1997), la pro-insuline (Simonson et al. 1996) et le "granulocyte colony stimulating factor-1" (Dhawan et al. 1996; Moisset et al. 2000). Des sécrétions locales ont aussi été démontrées par l'implantation de myoblastes sécrétant des protéines anti-arthritiques dans les jointures de souris, comme traitement de l'arthrite (Day et al. 1997); ou l'implantation de myoblastes sécrétant des facteurs "neurotrophiques" dans le système nerveux central, comme traitement de maladies neurodégénératives (Deglon et al. 1996).

2.6.3.5 Thérapie par l'utilisation de cellules souches

L'utilisation de cellules de la moelle osseuse pour former du tissu musculaire a récemment soulevé un grand intérêt. La découverte de l'implication des cellules de la moelle osseuse dans la régénération musculaire ouvre la porte à une nouvelle thérapie pour le traitement de la dystrophie musculaire. En effet, les cellules de la moelle osseuse semblent participer à la formation de fibres musculaires normales, en migrant de la circulation sanguine aux sites de régénération (Ferrari et al. 1998; Gussoni et al. 1999). De plus, l'injection de cellules de la moelle osseuse directement dans le muscle a permis la production de fibres musculaires, à un taux plus faible cependant, que l'injection de cellules d'origine musculaire (Ferrari et al. 1998). Cependant, le faible taux de migration des cellules de la moelle osseuse aux muscles ne permet pas d'envisager cette application comme traitement des dystrophies musculaires. En effet, le groupe de Weinberg a récemment rapporté le cas d'un enfant ayant reçu une transplantation de moelle osseuse pour une déficience immune sévère et qui a été diagnostiqué DMD à l'âge de 12 ans. L'analyse des muscles a révélé la présence de noyaux provenant du donneur de la greffe de moelle osseuse, mais un très faible pourcentage (0,5 – 0,9 %) de fibres dystrophine positives étaient présentes (Gussoni et al. 2002).

À l'inverse, les cellules dérivées du tissu musculaire squelettique contiennent des cellules souches permettant de repeupler la moelle osseuse et de se différencier en plusieurs lignées hématopoïétiques (Gussoni et al. 1999; Jackson, K. A. et al. 1999; Cao et al. 2003).

Chapitre 3. Le système immunitaire

3.1 Introduction à l'immunobiologie

Le système immunitaire sert de défense contre les organismes étrangers s'introduisant à l'intérieur d'un individu. Ce système de défense est capable de discriminer entre ce qui lui appartient et ce qui doit être détruit. Les cellules du système immunitaire originent de la moelle osseuse. Ces cellules mûrissent et migrent dans différents tissus lymphoïdes, où elles effectuent leurs fonctions respectives.

On distingue trois types cellulaires majeurs impliqués de manière active dans le système immunitaire: les lymphocytes T, les lymphocytes B et les phagocytes. Les lymphocytes sont impliqués dans les mécanismes de défense spécifiques tandis que les phagocytes se partagent les défenses innées. Toutes les cellules du système immunitaire originent de cellules souches hématopoïétiques (cellules présentes dans la moelle osseuse). La Figure 3.1 résume l'hématopoïèse. Ces cellules souches peuvent se différencier en cellules progénitrices, qui donneront ensuite naissance à différents types cellulaires. Les progénitrices lymphoïdes donnent naissance aux lymphocytes et aux cellules NK. Les progénitrices myéloïdes sont les précurseurs des granulocytes, des macrophages, des cellules dendritiques et des mastocytes du système immunitaire (Janeway et al. 2001).

Les lymphocytes jouent un rôle prédominant dans la défense immunitaire spécifique. La maturation des lymphocytes T s'effectue au thymus, en suivant un processus complexe décrit au point 3.2.2.1, tandis que les lymphocytes B mûrissent au niveau de la moelle osseuse. Les lymphocytes sont les cellules responsables de la reconnaissance spécifique des antigènes. On distingue deux types de lymphocytes T: les lymphocytes T CD4⁺ et les lymphocytes T CD8⁺. Les CD4⁺ ont la fonction d'activer les autres lymphocytes en sécrétant des protéines solubles appelées cytokines, et sont appelés T_H (lymphocytes T CD4⁺ « helper »). Certains lymphocytes CD4⁺ ont aussi une activité cytotoxique. Les CD8⁺ ont une activité cytolytique et éliminent les cellules étrangères ou les cellules infectées par un virus ou un parasite intracellulaire.

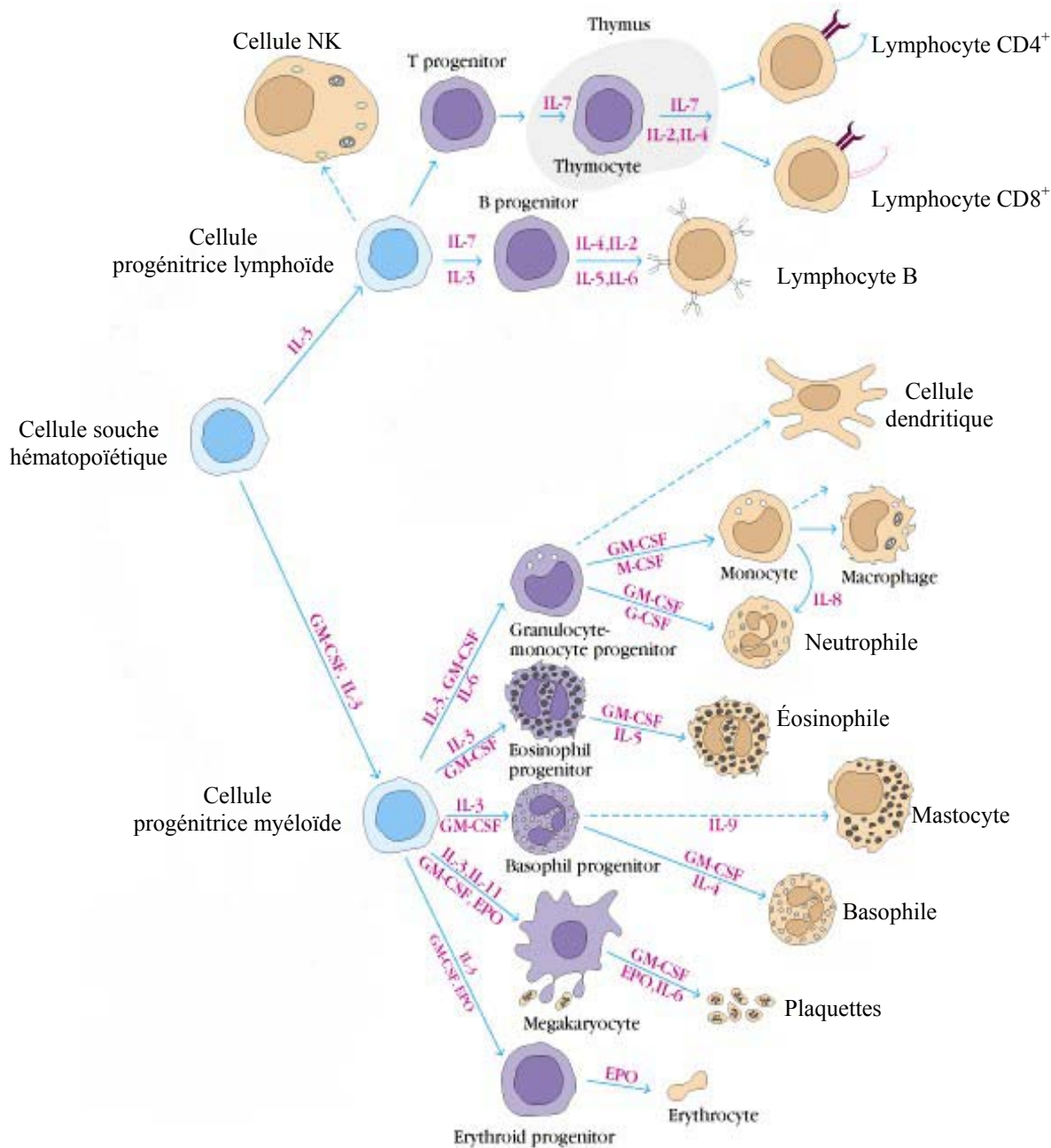


Figure 3.1 : Hématopoïèse du système immunitaire originant d'une cellule souche de la moelle osseuse.

(Goldsby et al. 2000)

Les lymphocytes B sécrètent des anticorps qui sont spécifiques aux antigènes étrangers présents chez un individu, et servent aussi de sentinelles en captant les protéines solubles circulantes pour activer une réponse immune.

Au niveau de la lignée myéloïde, les macrophages et les cellules dendritiques ont une fonction accessoire à la réponse immunitaire (i.e. le rejet actif des antigènes étrangers). Ces cellules, appelées phagocytaires, ingèrent les antigènes pour les présenter aux lymphocytes dans une disposition adéquate pour générer une réponse immunitaire. On les appelle des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les macrophages et les cellules dendritiques n'ont pas la capacité de reconnaître spécifiquement des antigènes. D'autres types cellulaires comme les neutrophiles, les mastocytes et les cellules NK sont impliquées dans certaines fonctions du système immunitaire. Ces cellules n'ont pas la capacité de reconnaître spécifiquement des antigènes et leurs fonctions dépassent l'intérêt du présent document.

Le système immunitaire possède ainsi plusieurs caractéristiques qui augmentent son efficacité. En premier lieu, la spécificité de reconnaissance des antigènes discrimine entre les antigènes du soi et ceux du non-soi et élimine ainsi les invasions étrangères. Les lymphocytes stimulés possèdent une "mémoire" qui leur permet de répondre rapidement à une rencontre subséquente du même antigène. Le système immunitaire est enfin doté d'une capacité de reconnaissance d'un vaste bassin d'antigènes, ce qui lui attribue sa qualité d'adaptation.

3.2 Mécanismes de réponse immunitaire

3.2.1 Mécanisme de reconnaissance des antigènes par les lymphocytes

Comme mentionné en introduction de ce chapitre, les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B servent de CPA et activent les lymphocytes T qui réagissent contre l'antigène présenté. La présentation des antigènes par les CPA fournit les molécules d'activation nécessaires aux lymphocytes. Principalement, les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) présentent les peptides et tout ce complexe est reconnu par le récepteur des cellules T (RcT). Les CMH sont différents d'un individu à

l'autre, à condition que ces individus soient génétiquement différents. Les CMH servent donc de « carte d'identité » immunitaire. Les lymphocytes circulants sont tolérants à leurs propres CMH présentant un peptide du soi, grâce à un principe de sélection. Un lymphocyte peut s'activer et engendrer une réponse immunitaire si une CPA présente un peptide étranger ou si cette CPA possède des CMH étrangers. Au niveau des lymphocytes B, la reconnaissance des antigènes peut s'effectuer directement à l'aide de récepteur des cellules B, dépendamment de la nature de l'antigène.

3.2.1.1 Le complexe majeur d'histocompatibilité

Les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité codent pour des molécules qui s'expriment à la surface des cellules. Ces molécules appartiennent au système HLA (« Human Leukocyte Antigen ») chez l'humain, qui est le système impliqué dans le rejet des greffes inter-individus non identiques génétiquement. Les gènes HLA se retrouvent sur le chromosome 6, tandis que chez la souris, les gènes codant pour les CMH sont appelés H-2 et se retrouvent sur le chromosome 17 (Figure 3.2) (Benjamini et al. 1996). On distingue trois classes de gènes qui s'assemblent pour former des molécules différentes : CMH de classe I, II et III. Parmi les gènes des CMH de classe I, on retrouve les HLA-A, B et C chez l'humain et H-2K, D et L chez la souris, tandis que les loci codant pour les HLA-DP, DQ et DR chez l'humain et I-A et I-E chez la souris sont dans la catégorie de CMH de classe II. La plupart de ces gènes sont très polymorphiques et chaque allèle s'exprime en co-dominance, ce qui permet la disparité entre individus d'une même espèce. Les gènes des CMH de classe III codent pour des facteurs impliqués dans le système du complément et d'autres systèmes n'ayant aucune fonction immune.

Les molécules des CMH de classe I sont des glycoprotéines hétérodimériques transmembranaires composées d'une chaîne α de 44 kDa et d'une chaîne légère appelée β_2 -microglobuline (β_2 M, non codée par le locus CMH) de 12 kDa. La partie extracellulaire de la chaîne α est divisée en trois domaines globulaires : α_1 , α_2 et α_3 . Les domaines α_1 et α_2 servent à la liaison d'un antigène et sont des régions variables, tandis que le domaine α_3 est essentiellement conservé (Figure 3.3). La variabilité des domaines α_1 et α_2 permet la liaison d'un grand nombre de peptides aux molécules de CMH.

Les CMH de classe I sont exprimés sur toutes les cellules somatiques et leur reconnaissance est restreinte aux lymphocytes CD8⁺ (voir section 3.2.3). Les peptides, présentés par les CMH de classe I, sont endogènes, i.e. qu'ils sont généralement synthétisés à l'intérieur de la cellule (comme les antigènes viraux). Ces antigènes sont découpés en peptides par le protéasome dans le cytosol. La longueur des peptides capables de se lier à la niche peptidique du CMH de classe I varie de 10 à 20 acides aminés. Le polymorphisme de la niche peptidique des différents allèles génère une variation chimique permettant ainsi différentes affinités à différents peptides. D'autres résidus polymorphiques de la molécule de classe I forment des contacts avec les récepteurs des cellules T (RcT). Ainsi, les RcT interagissent spécifiquement avec les CMH et le peptide qu'ils présentent.

Les CMH de classe II sont composés de deux chaînes polypeptidiques non-covalentes (α et β). Ces deux chaînes sont codées aux locus des CMH de classe II. Comme les molécules de classe I, les CMH de classe II possèdent un polymorphisme élevé et chaque allèle est exprimé en co-dominance. Cette expression co-dominante permet l'association des chaînes α et β des deux allèles, générant ainsi plusieurs molécules différentes pouvant être exprimées à la surface d'une même cellule. La distribution des molécules de classe II est plus limitée que celle de classe I. Les molécules de classe II s'expriment de manière constitutive seulement sur les cellules comme les lymphocytes B, les cellules dendritiques et les cellules de l'épithélium thymique. Plusieurs autres types cellulaires, dont les macrophages et les myoblastes, expriment le CMH de classe II sous induction par des facteurs comme l'interféron- γ . Les molécules de classe II se retrouvent aussi sur les lymphocytes T activés humains, mais pas chez la souris. La liaison d'un CMH de classe II est restreinte à un RcT exprimé sur les lymphocytes T CD4⁺ (voir section 3.2.1.2). La fonction phagocytaire des CPA, exprimant les CMH de classe II, permet la présentation de peptides exogènes par ces molécules. Les particules phagocytées par les CPA se retrouvent dans les endosomes pour être clivées par des protéases. Les endosomes fusionnent avec les vésicules de l'appareil de Golgi contenant les CMH de classe II (Abbas et al. 1991). Les CMH de classe II se retrouvent ensuite à la surface des CPA pour permettre une présentation d'antigène aux lymphocytes T.

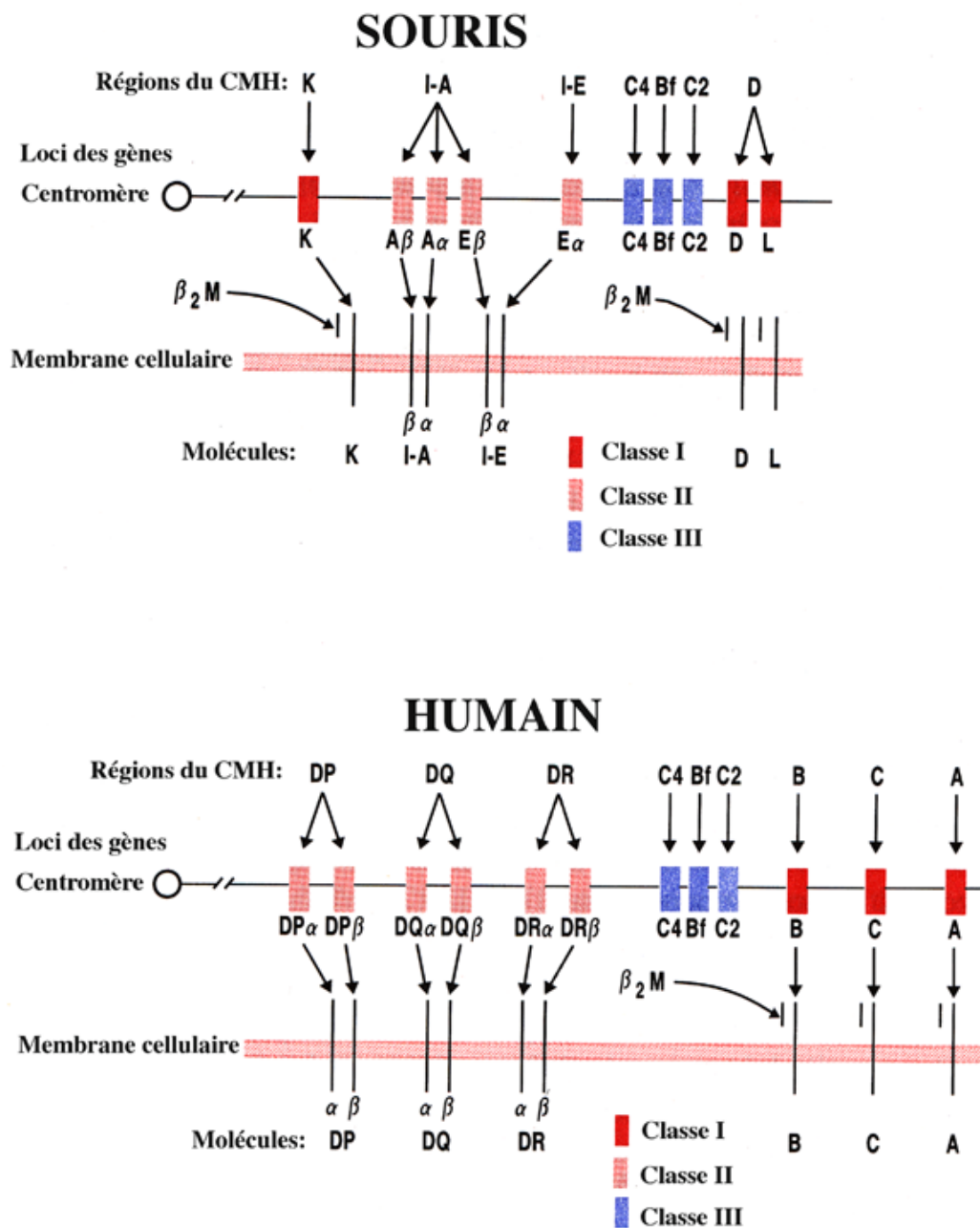


Figure 3.2: Les complexes majeurs d'histocompatibilité murin et humain.

(Benjamini et al. 1996)

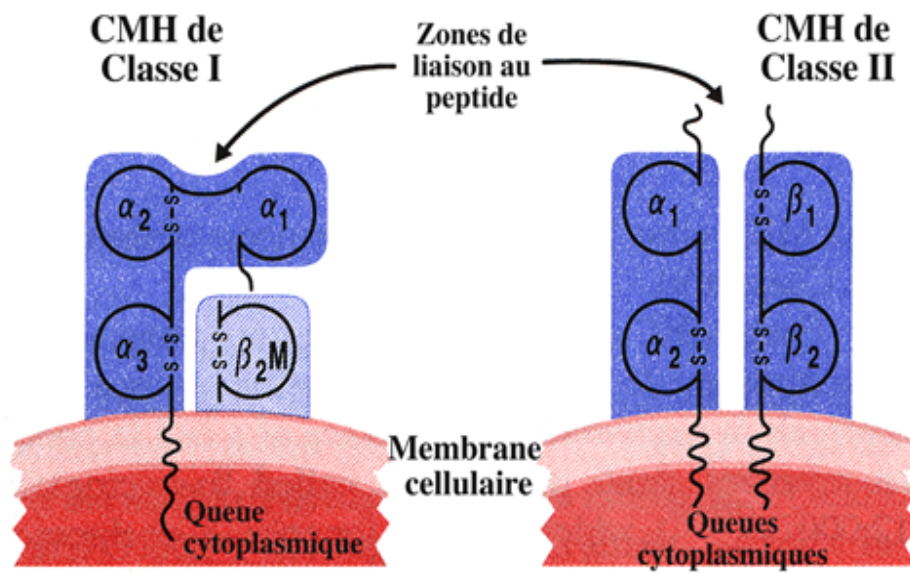


Figure 3.3: La structure des CMH de classe I et de classe II.

(Benjamini et al. 1996)

Le polymorphisme élevé des molécules du CMH de classe I et II contribue grandement au rejet des greffes entre individus. C'est pourquoi la caractérisation de ces molécules, préalablement à une greffe, est essentielle pour déterminer les donneurs les plus compatibles avec un individu receveur donné afin de diminuer l'intensité du rejet.

3.2.1.2 Le récepteur des cellules T (RcT)

Le récepteur d'un lymphocyte T interagit avec le CMH présentant un peptide sur une autre cellule. La fonction du RcT est de déterminer si ce peptide est étranger ou non. Pour comprendre ce phénomène, il faut analyser en premier lieu la structure du RcT. Le RcT est composé de deux chaînes polypeptidiques hétérodimères (chaînes α et β ou, plus rarement, chaînes γ et δ), liées de manière covalente par des ponts disulfures (Abbas et al. 1991). Ces chaînes sont composées de domaines constants et variables. Les parties variables se situent vers l'extrémité N-terminale et sont responsables de la reconnaissance d'un antigène présenté par un CMH. Les parties variables sont générées par un réarrangement génique complexe, produisant ainsi de grandes possibilités d'affinité à différents peptides. Contrairement aux CMH, un seul type de RcT est exprimé sur un lymphocyte. Seuls les lymphocytes T, réagissant contre un antigène reconnu spécifiquement par leur RcT, vont générer une réponse immunitaire.

L'affinité de la liaison du RcT avec le CMH est insuffisante pour générer une activation du lymphocyte T. Les molécules CD4 et CD8 sur les lymphocytes viennent stabiliser et renforcer la liaison RcT-CMH. Le CD8 lie les CMH de classe I tandis que le CD4 possède une affinité pour les CMH de classe II. Ce qui explique la restriction des CMH aux types de lymphocytes CD4⁺ ou CD8⁺.

Le RcT est accompagné de plusieurs autres molécules de surface essentielles à l'activation d'un lymphocyte T. Parmi celles-ci, on distingue le CD3. Le CD3 est un complexe protéique formé de 5 chaînes différentes (les chaînes γ , δ , ϵ , ζ et η) qui s'associent pour former 3 dimères : un hétérodimère gamma et epsilon ($\gamma\epsilon$), un hétérodimère delta et epsilon ($\delta\epsilon$) et soit un homodimère formé de deux chaînes zêta ($\zeta\zeta$), soit un hétérodimère zêta et éta ($\zeta\eta$) (Abbas et al. 1991; Goldsby et al. 2000). L'hétérodimère $\zeta\eta$ ne se retrouve que dans 10% des CD3. La chaîne éta résulte d'un épissage alternatif du

gène zêta. Les chaînes du CD3 sont responsables de la signalisation moléculaire du RcT, menant à l'activation du lymphocyte. Chacune des chaînes du CD3 possède des sites de phosphorylation de tyrosines au niveau intracellulaire (ITAM, « immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Ces ITAM servent de substrat pour des kinases de la famille Src (Lck et Fyn). Il se déclenche alors une cascade complexe d'activation de différentes enzymes. L'activation lymphocytaire est décrite plus en détails à la section 3.2.3.

3.2.1.3 Le récepteur des lymphocytes B (RcB)

Le récepteur des lymphocytes B est composé d'une immunoglobuline (Ig) transmembranaire et de deux hétérodimères liés par des liens disulfures appelés Ig- α /Ig- β . Les chaînes Ig- α et Ig- β possèdent une longue queue cytoplasmique qui leur permet d'interagir avec des molécules de signalisation intracellulaire.

3.2.1.4 Les immunoglobulines (Ig)

Les principaux acteurs d'une réaction humorale sont les immunoglobulines, appelées aussi anticorps. Ces molécules sont produites par les lymphocytes B. Les immunoglobulines sont constituées de quatre chaînes peptidiques : deux chaînes légères identiques de 25 kDa et deux chaînes lourdes identiques de 50 kDa et plus (Figure 3.4). Chaque chaîne légère est liée à une chaîne lourde par des liens disulfures. Enfin les deux chaînes lourdes sont reliées entre elles par ces mêmes liens. Chaque chaîne contient des régions constantes et des régions variables. Les régions variables sont constituées d'environ 110 acides aminés et sont différentes pour chaque lymphocyte B. Généralement, un lymphocyte B ne produit qu'un seul type d'Ig spécifique. À l'intérieur des régions variables se retrouvent les régions hypervariables. Il existe trois de ces régions par chaîne lourde et légère et elles constituent de 15-20% du domaine variable. Les régions hypervariables sont les portions des Ig qui lient les antigènes. La portion de l'antigène qui est reconnue par les Ig se nomme épitope. La diversité du répertoire de reconnaissance des antigènes par les Ig est attribuable à 4 processus majeurs :

- 1) Les régions variables sont formées par la recombinaison des gènes V et J pour les chaînes légères et V, D et J pour les chaînes lourdes.

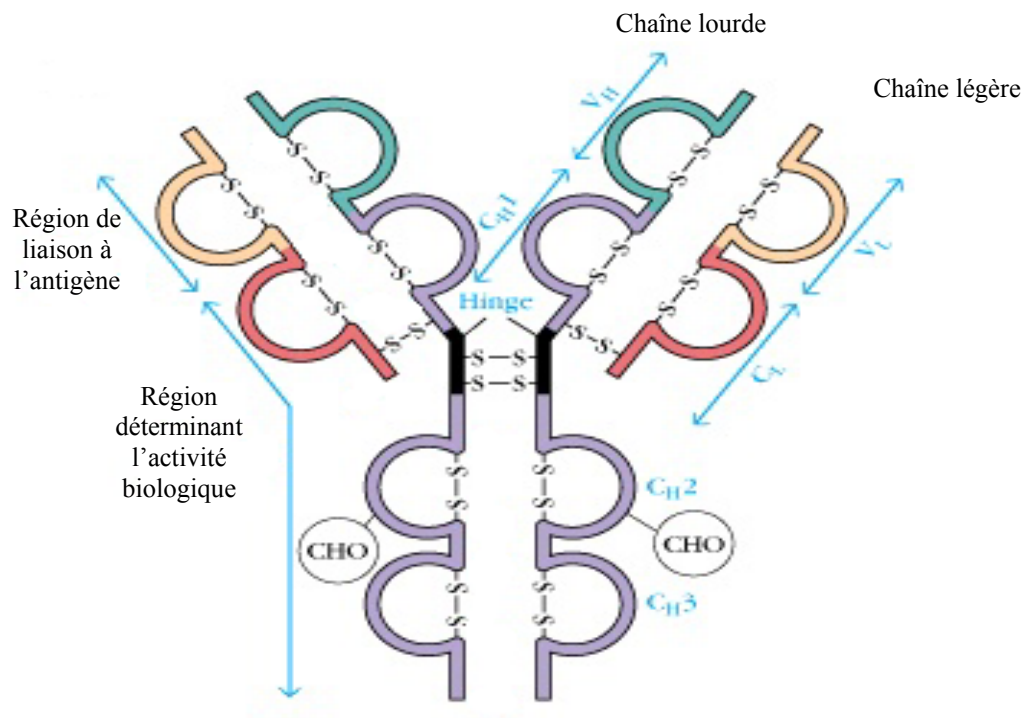


Figure 3.4 : Schéma d'une immunoglobuline. C : parties constantes, V : parties variables.

(Goldsby et al. 2000)

- 2) Les gènes V existent en plusieurs copies différentes à l'intérieur du génome. Une seule de ces copies sera sélectionnée aléatoirement.
- 3) La combinaison des chaînes lourdes et légères lors de la formation d'une molécule d'Ig complète augmente la diversité
- 4) Le lymphocyte B mature subit des mutations au niveau des gènes de la région variable réarrangés.

Il existe 5 classes différentes d'immunoglobulines : IgG, IgM, IgA, IgE, IgD. Chaque classe d'Ig est différencié par différentes chaînes lourdes : γ , μ , α , ϵ , δ . Chaque classe peut aussi posséder différentes chaînes légères : κ ou λ . Chaque Ig est composé de deux chaînes lourdes identiques et de deux chaînes légères identiques. De plus, les IgG et IgA se subdivisent en sous-classe, dû à des différences mineures en acides aminés de leurs chaînes γ et α . Chez l'humain, les IgA se sub-divisent en deux ($\alpha 1$ et $\alpha 2$) et les IgG en quatre ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ et $\gamma 4$). Chez la souris, seulement les IgG se subdivisent en quatre sous-classes ($\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$ et $\gamma 3$).

Les classes d'Ig possèdent des activités biologiques différentes dues à leurs séquences différentes des régions constantes des chaînes lourdes. Par exemple, les IgG peuvent traverser le placenta, les IgG et les IgM activent la voie classique du complément et les IgE possèdent une haute affinité avec les récepteurs des Ig sur les mastocytes et les basophiles.

3.2.2 La maturation lymphocytaire

Les organes lymphoïdes sont des tissus organisés contenant un grand nombre de lymphocytes dans un contexte de cellules non-lymphoïdes. Ils se sous divisent en organes lymphoïdes primaires ou centraux (thymus et moelle osseuse) et secondaires ou périphériques (rate, ganglions lymphatiques, etc.). C'est dans les organes lymphoïdes primaires que mûrissent les lymphocytes, tandis que les réponses immunes spécifiques sont initiées dans les organes lymphoïdes secondaires. Une fois leur maturation terminée, les lymphocytes entrent dans la circulation sanguine et vont se loger aux organes lymphoïdes secondaires.

3.2.2.1 Principe de sélection thymique

La grande diversité de reconnaissance des antigènes par les RcT et les anticorps permet aux lymphocytes T et B de réagir contre la majorité des pathogènes rencontrés tout au long de la vie d'un individu. Par contre, cette grande diversité de reconnaissance englobe la possibilité de réagir aussi contre les antigènes du soi. Conséquemment, le système immunitaire élimine par un principe de sélection les lymphocytes réagissant trop fortement ou trop faiblement contre les antigènes du soi. Les lymphocytes sélectionnés positivement permettent la défense contre les antigènes étrangers reconnus dans un contexte CMH, tandis que la sélection négative est essentielle pour éviter les réactions auto-immunitaires (réactions dirigées contre des antigènes du soi) (Benjamini et al. 1996).

Les lymphocytes T immatures migrent de la moelle osseuse vers le thymus. Cette migration débute vers le 11^e jours de gestation chez la souris et entre la huitième et la neuvième semaine de gestation chez l'humain. Le thymus continue à se développer durant les 3^e et 4^e semaines après la naissance chez la souris, tandis que chez l'humain, le thymus est complètement formé à la naissance. Après la puberté, le thymus commence à diminuer en taille, dû à une production diminuée de nouveaux lymphocytes T. Le thymus est composé en plusieurs lobules divisés en une région corticale externe, appelée le cortex thymique, et une région interne appelée médulla (Figure 3.5) (Goldsby et al. 2000).

À leur arrivée au thymus, les progéniteurs lymphoïdes n'expriment pas de molécules de surface caractéristiques aux lymphocytes. Ces progéniteurs vont passer une première phase de maturation en lignée lymphocytaire, qui dure environ une semaine. Ils vont interagir avec un réseau de cellules épithéliales dans le cortex thymique, ce qui leur permettra d'acquérir certaines molécules de surface spécifiques aux lymphocytes T, dont le CD2 (chez la souris) et Thy-1 (Figure 3.6). Passé ce stade, les cellules sont appelées thymocytes « doubles négatifs » puisqu'elles n'expriment pas encore le complexe CD3/RcT et le co-récepteur CD4 ou CD8. Par la suite, les thymocytes « doubles négatifs » sont subdivisés selon leur expression des molécules CD25 (récepteur de l'IL-2), CD44 (molécule d'adhésion) et c-kit (récepteur du « stem cell factor »). Lorsque les thymocytes expriment CD44 et CD25, les gènes codant pour la chaîne β du RcT se réarrangent pour être exprimée. Les cellules qui échouent ce réarrangement meurent, alors que les cellules qui réussissent et

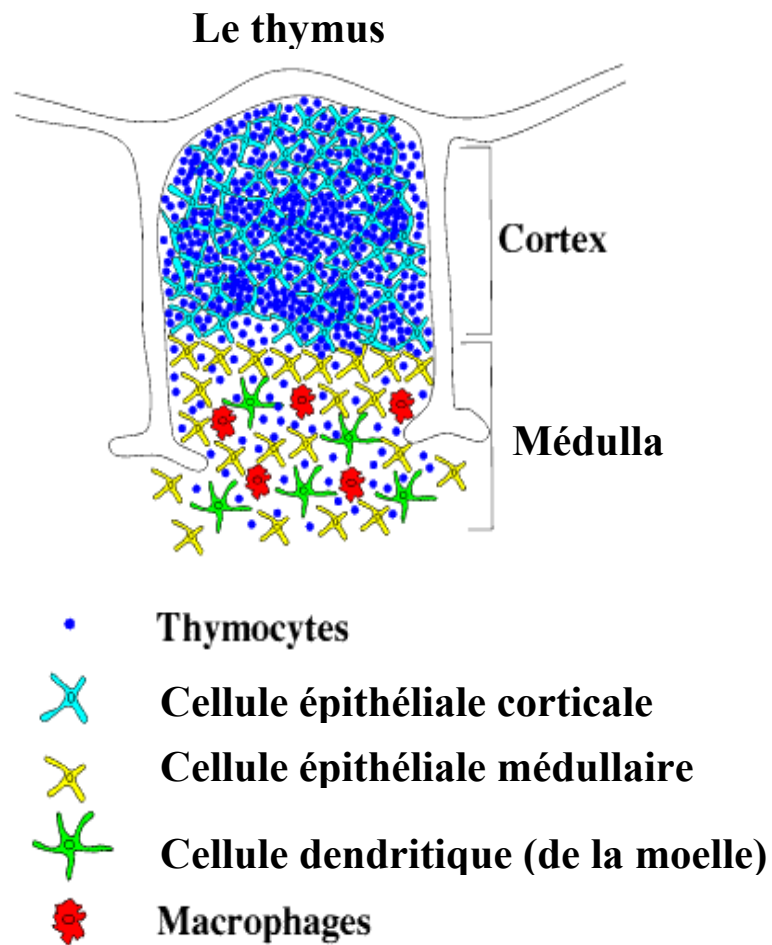


Figure 3.5 : Schéma d'une partie du thymus où s'effectue la sélection thymique.

(Goldsby et al. 2000)

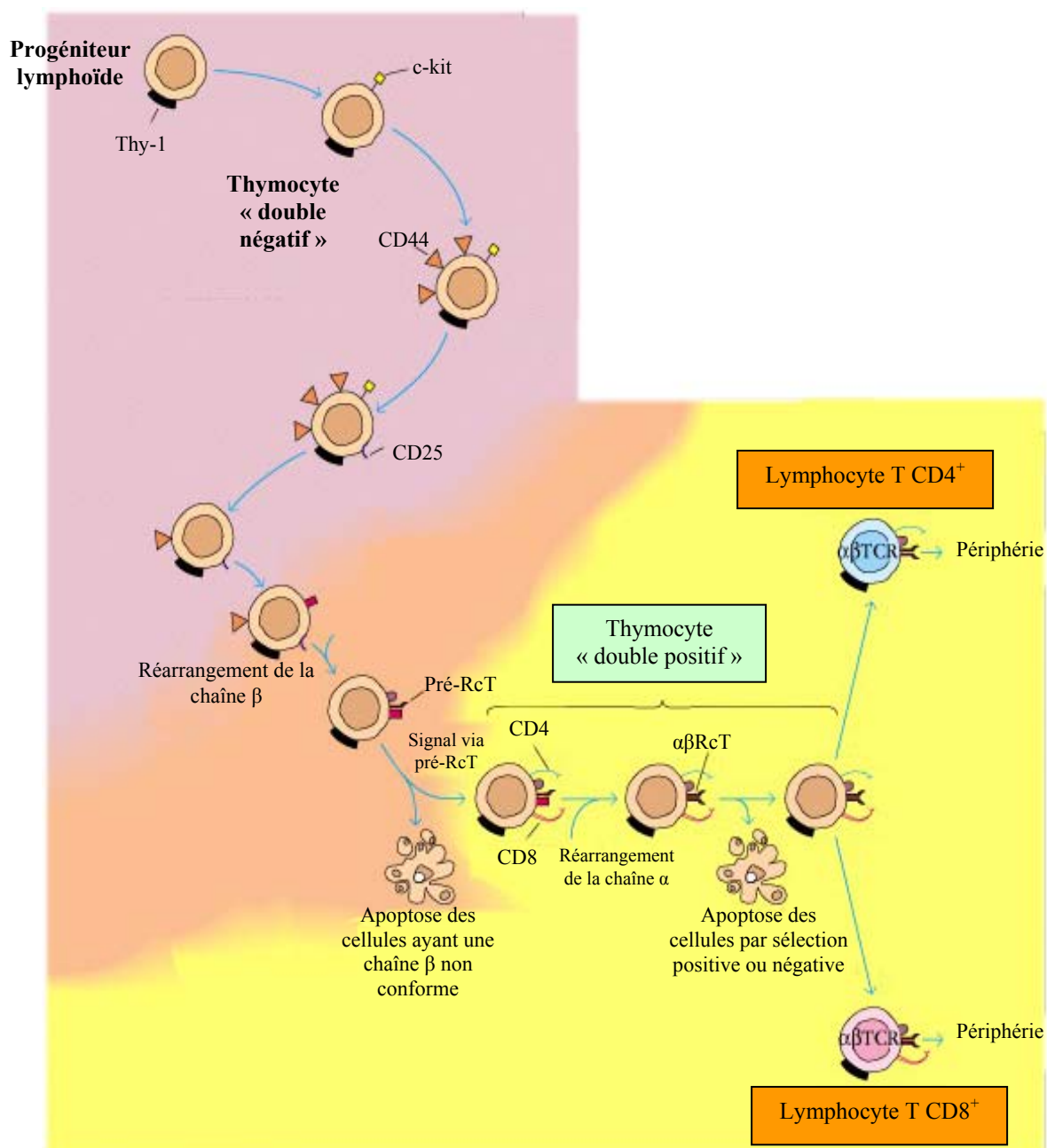


Figure 3.6 : Développement des lymphocytes T au niveau thymique.

(Goldsby et al. 2000)

produisent une chaîne β fonctionnelle, survivent et perdent l'expression de CD25. La chaîne β s'assemble avec une chaîne α substitut pour former le pré-récepteur T (pré-RcT), accompagné du CD3. L'assemblage CD3/pré-RcT engendre une prolifération et l'expression des molécules CD4 et CD8, appelés thymocytes « doubles positifs ». Lorsque la prolifération s'arrête, les gènes codant pour la chaîne α se réarrangent et cette chaîne α est exprimée à la surface avec la chaîne β , formant ainsi un RcT fonctionnel. Par la suite, les cellules « doubles positives » passent un processus de sélection positive avant de migrer vers la médulla.

3.2.2.1.1 La sélection positive

La sélection positive permet la survie des thymocytes qui possèdent une bonne affinité avec les CMH de classe I et II exprimés (présentant un peptide du soi) sur les cellules épithéliales du cortex thymique. Cette sélection est nécessaire pour induire une réponse immunitaire restreinte aux molécules du CMH. Ainsi les thymocytes « doubles positifs » interagissent avec les CMH I et II par leur RcT et les molécules CD8 et CD4 respectivement. Les thymocytes qui ne se lient pas aux CMH mourront par apoptose dans les jours suivants (Figure 3.7). La sélection positive permet aussi de différencier les lymphocytes en $CD4^+$ ou $CD8^+$. Suite à leur sélection, les lymphocytes n'expriment qu'une seule de ces deux molécules. Cette discrimination dépendra du type de CMH avec lequel le thymocyte aura le plus d'affinité. Une meilleure affinité pour le CMH I produira des lymphocytes T $CD8^+$, tandis qu'une meilleure affinité pour le CMH II engendrera des lymphocytes T $CD4^+$. La plupart des lymphocytes (> 95%) ne survivront pas à ce processus de sélection positive. Les thymocytes sélectionnés positivement passent ensuite à la médulla, où ils subiront la sélection négative.

3.2.2.1.2 La sélection négative

Les affinités entre les RcT et les CMH peuvent varier de faible à forte. La sélection négative permet la discrimination entre les différentes affinités et ainsi élimine les thymocytes qui réagissent fortement aux interactions entre le CMH présentant un peptide du soi (Figure 3.7). Cette sélection est importante pour développer une tolérance au soi. La médulla est composée de différents types cellulaires dont les plus importants sont les

cellules dendritiques et macrophages dérivés de la moelle osseuse. Ces cellules exposent leur CMH de classe I et II et interagissent avec les thymocytes. Les mécanismes précis de la sélection négative ne sont pas encore connus, mais les cellules meurent par apoptose.

Une fois ces deux sélections terminées, les lymphocytes T sont de petite taille et en état de repos. Ils se retrouveront dans le système immunitaire périphérique et migreront dans les organes lymphoïdes secondaires où ils pourront effectuer leur tâche de reconnaissance des antigènes étrangers.

3.2.2.2 Principe de sélection des lymphocytes B

Les lymphocytes B originent de la moelle osseuse. Les cellules souches lymphoïdes se différencient en cellules de la lignée des lymphocytes B, appelées Pro-B (pour progénitrices). Ces cellules Pro-B expriment CD45R (connu aussi sous B220 chez la souris), une tyrosine phosphatase transmembranaire. Après une prolifération au niveau de la moelle osseuse, une différenciation subséquente en cellules Pré-B (pour précurseurs) nécessite une interaction avec les cellules stromales. Les cellules stromales de la moelle osseuse jouent deux rôles importants : interaction directe avec les Pro et Pré-B, et sécrétion de cytokines, comme l'IL-7, nécessaires au processus de développement.

La séquence du développement des lymphocytes B nécessite certains signaux médiés par les cellules stromales. Les cellules Pro-B interagissent avec des molécules d'adhésion, comme VLA-4 et VCAM-1, présents sur la cellule Pro-B et la cellule stromale respectivement. Après ce contact initial, s'exprime alors un récepteur sur la Pro-B, appelé c-Kit. C-Kit interagit avec son ligand, « stem cell factor » (SCF). C-Kit étant une tyrosine kinase, son activation engendre la prolifération et la différenciation des Pro-B en Pré-B. Pour compléter leur maturation, les cellules Pré-B expriment le récepteur à l'IL-7. La sécrétion d'IL-7 est essentielle à leur différenciation. CD25 (récepteur à l'IL-2) est alors exprimé ainsi que, suite à un réarrangement génique codant pour la chaîne lourde des immunoglobulines, le récepteur des lymphocytes Pré-B. Cela induit un processus de plusieurs divisions cellulaires menant au réarrangement génique des chaînes légères des immunoglobulines. La cellule devient alors un lymphocyte B immature, exprimant une IgM complète à sa surface et subira une sélection envers les antigènes du soi. Les cellules B qui

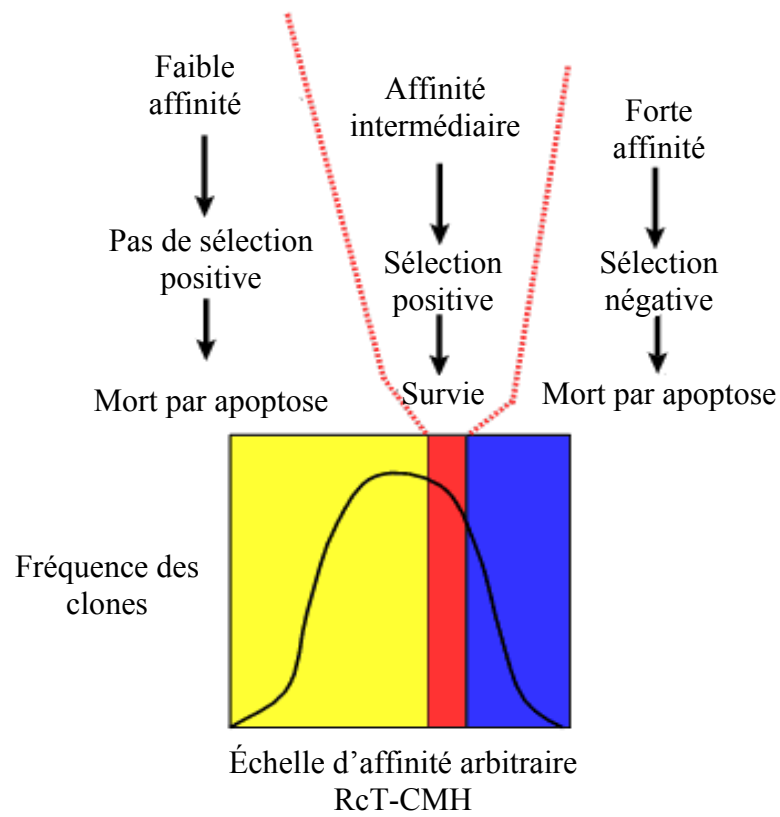


Figure 3.7 : Proportion des lymphocytes T survivant une sélection thymique selon leur affinité RcT-CMH.

(Goldsby et al. 2000)

survivront à cette sélection se retrouveront dans les organes lymphoïdes secondaires, où elles deviendront des lymphocytes B matures, exprimant en plus une IgD à sa surface et pouvant être activées par des antigènes exogènes (Janeway et al. 2001).

Lorsque la cellule B immature exprime une IgM à sa surface, sa survie dépend de la nature des signaux qu'elle recevra par ce récepteur. Si un lymphocyte B immature ne réagit contre aucun antigène du soi, la cellule est sauvée et elle poursuivra sa différenciation. Par contre, les lymphocytes B immatures qui recevront un signal par le récepteur IgM, quatre destins possibles se présentent alors: la mort par apoptose, la production d'un nouveau récepteur réarrangé, l'induction d'un état de non-réponse permanente aux antigènes (anergie) et l'ignorance. L'ignorance se définit par une cellule ayant une certaine affinité pour un antigène du soi, mais qui n'a pas été mise en contact avec cet antigène puisqu'il est séquestré, en basse concentration ou qu'il ne « cross-link » pas le récepteur des lymphocytes B.

La cellule B immature subira une délétion clonale par apoptose lorsqu'elle réagira aux antigènes du soi par plusieurs récepteurs simultanément. Par contre, la cellule B immature peut encore réarranger sa chaîne légère et réexprimer un nouveau récepteur à sa surface, qui pourrait être non-réactif au soi.

Si la cellule B immature reçoit un faible signal par son récepteur, causé par une réactivité de faible valence, comme à des antigènes solubles, elle entre en un état d'inactivation permanente aux antigènes (anergie). Ces cellules ne peuvent s'activer envers leur antigène spécifique, même en présence d'aide par les cellules T CD4⁺. Ces cellules vont migrer aux organes lymphoïdes secondaires, mais mourront relativement tôt, dû à leur incapacité de s'activer.

Finalement, les cellules B immatures qui possèdent une faible affinité à des antigènes du soi et que ceux-ci ne « cross-link » pas le récepteur resteront en état d'ignorance face à leur antigène (ignorance). Ces cellules mûrissent comme si elles étaient non-réactives au soi. On pourrait penser que ces cellules pourraient causer des maladies auto-immunes en s'activant contre un antigène du soi, lors de circonstances particulières (Janeway et al. 2001).

3.2.3 Activation des cellules effectrices du système immunitaire

3.2.3.1 Activation des lymphocytes T CD4⁺

La coopération entre les cellules du système immunitaire est essentielle pour développer une réponse adéquate contre un antigène. L'activation des lymphocytes T nécessite la présentation des antigènes étrangers par une CPA (macrophage, cellule dendritique ou lymphocyte B). De manière générale, les lymphocytes T ne sont pas activés par des antigènes qui ne sont pas présentés par un CMH. L'engagement d'un RcT avec un CMH de classe II, présentant un peptide immunogène sur une CPA, consiste en le premier signal d'activation du lymphocyte T CD4⁺. Le complexe formé du CMH-CD4-RcT-CD3 génère un faible signal d'activation du lymphocyte. Cette liaison doit préalablement se solidifier par l'interaction de molécules d'adhésion. Parmi celles-ci, on retrouve principalement le LFA-1 (« lymphocyte function-associated antigen-1 »; CD11a-CD18), CD2 et ICAM-3 (« intracellular adhesion molecule-1 »; CD54) sur le lymphocyte T et ICAM-1, ICAM-2, LFA-3 et DC-SIGN sur la CPA (Figure 3.8). Lorsqu'un lymphocyte T naïf reconnaît le peptide présenté par une CPA, il y a changement de conformation du LFA-1, ce qui augmente grandement son affinité pour ses ligands ICAM-1 et ICAM-2 (Janeway et al. 2001).

L'activation complète des lymphocytes nécessite un second signal, appelé co-stimulation, qui doit être reçu au moment de la reconnaissance de l'antigène par le RcT (Figure 3.8). Les molécules de co-stimulation les mieux caractérisées sont B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86). Les homodimères B7 font partie de la superfamille des immunoglobulines et sont retrouvées à la surface des cellules stimulant la prolifération cellulaire (CPA). Leur récepteur sur le lymphocyte T est le CD28. Le CD28 est exprimé constitutivement sur les lymphocytes et sa liaison engendre la division cellulaire et la production d'IL-2. Lorsqu'un lymphocyte T naïf s'active, il exprime alors plusieurs protéines qui contribuent au maintien du signal de co-stimulation et permet l'expansion et la différenciation de celui-ci. Une de ces protéines est le CD154 (CD40L) dont le ligand est le CD40 exprimé sur la CPA. La liaison CD154-CD40 active le lymphocyte, mais aussi active la CPA à exprimer la molécule B7. CD154 fait partie de la famille de récepteurs TNF (« tumor necrosis factor »).

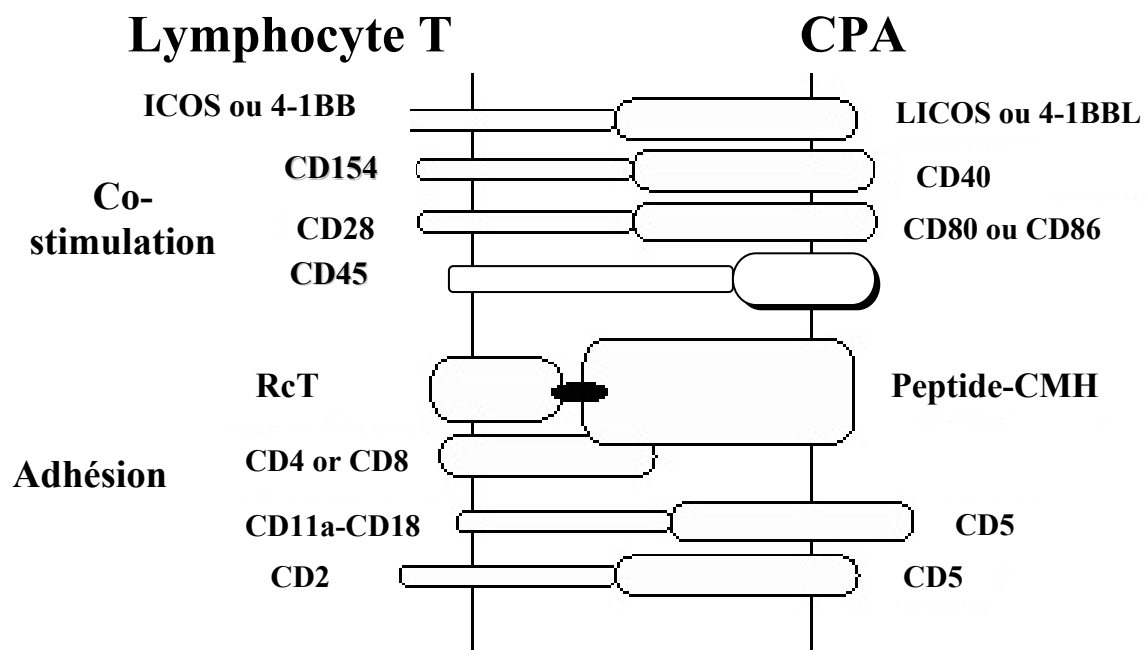


Figure 3.8 : Schéma des interactions d'un lymphocyte avec une CPA.

Une autre molécule de co-stimulation des lymphocytes T est la molécule 4-1BB (CD137) qui lie 4-1BBL sur les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B activés. Comme l'interaction CD154-CD40, la liaison 4-1BB-4-1BBL est bidirectionnelle (Janeway et al. 2001). La protéine ICOS (« inducible costimulator ») est aussi reconnue comme permettant d'augmenter la réponse du lymphocyte T à une stimulation antigénique. ICOS est exprimé sur les lymphocytes T activés, et son ligand, LICOS, est exprimé sur les cellules dendritiques, les monocytes et les lymphocytes B activés. Malgré la ressemblance avec le CD28 pour induire la prolifération cellulaire, l'interaction ICOS-LICOS est différente dans sa production de cytokine. En effet, ICOS induit la production d'IL-10 tandis que CD28 induit la production d'IL-2.

La molécule CD45 est une protéine tyrosine phosphatase transmembranaire et s'exprime en plusieurs isoformes, encodés par différents exons (A, B et C) (Trowbridge et al. 1994). Le CD45 joue un rôle important dans la régulation, par le RcT, de l'activation des lymphocytes T. CD45 peut déphosphoryler des sites d'auto-phosphorylation et des résidus tyrosine à régulation négative de la famille des protéines tyrosine phosphatase Src, suggérant un double rôle de la molécule CD45. Le ligand du CD45 n'est pas encore identifié. Les lymphocytes T naïfs expriment l'isoforme CD45RA (poids moléculaire élevé), et les lymphocytes T effecteurs et mémoires expriment l'isoforme CD45RO (faible poids moléculaire). Le CD45RO s'associe au RcT et transduit les signaux plus efficacement, tandis que le CD45RA, n'est pas associé au RcT (Janeway et al. 2001). Les fonctions exactes des différents isoformes de la molécule CD45 ne sont pas élucidées, mais l'expression d'un grand nombre de molécule CD45 contenant l'exon B (CD45RB) est associée à un phénotype lymphocytaire TH1, tandis que l'expression d'un petit nombre de molécule CD45RB est associée à un phénotype lymphocytaire TH2 (Rothstein et al. 1999).

Une molécule importante dans l'homéostasie lymphocytaire est le CTLA-4 (« cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 »; CD152). Le CTLA-4 s'exprime tardivement après l'activation et lie avec une avidité 20 fois plus forte les molécules B7 que peut le faire CD28. La liaison CTLA-4-B7 induit un signal négatif au lymphocyte, qui diminue sa production d'IL-2 et sa prolifération (Janeway et al. 2001).

Les lymphocytes activés synthétisent des cytokines et entrent en division cellulaire. Les lymphocytes libèrent l'IL-2 et expriment la chaîne α du récepteur de l'IL-2 (CD25), permettant ainsi à cette cytokine d'agir de manière autocrine pour activer leur prolifération. Le récepteur de l'IL-2 est constitué de trois chaînes (α , β et γ). Lorsque les lymphocytes sont au repos, seulement les chaînes β et γ sont exprimées. D'autres cytokines sont aussi exprimées par les lymphocytes T CD4⁺, et ces cytokines sont importantes pour stimuler les autres cellules du système immunitaire. Par exemple, le relâchement d'IL-4 et IL-5 stimule l'activation des lymphocytes B reconnaissant l'antigène étranger à produire des anticorps contre cet antigène. La libération d'IL-2 par les cellules CD4⁺ peut aussi activer les lymphocytes CD8⁺ reconnaissant un antigène étranger présenté par un CMH de classe I (Benjamini et al. 1996). La fonction des lymphocytes CD4⁺ réside dans une orchestration et l'amplification des réponses immunes envers des antigènes. C'est pourquoi la communication intercellulaire est importante.

La différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïf peut se produire en deux directions : T_H1 ou T_H2. Les facteurs déterminants la direction de différenciation ne sont pas complètement compris à ce jour. En outre, la présence de cytokines, les signaux de co-stimulation utilisés et la nature de la liaison du peptide avec le CMH ont tous un effet. Les conséquences d'une différenciation T_H1 ou T_H2 sont importantes. La production de cellules T_H1 mène à une immunité cellulaire, tandis que la production de cellules T_H2 mène à une immunité humorale. La différence entre les cellules T_H1 et T_H2 réside dans les patrons de cytokines produites. Les cellules T_H1 sécrètent principalement l'INF- γ , l'IL-2, le TNF- α et le TNF- β , tandis que les cellules T_H2 sécrètent principalement l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et le TGF- β (Janeway et al. 2001).

3.2.3.2 Activation des lymphocytes T CD8⁺

Les lymphocytes T CD8⁺ sont aussi appelés cytotoxiques (cellule T cytotoxique, CTL), attribuable à leur fonction cytolytique. La stimulation des lymphocytes CD8⁺ requiert un signal généré par la liaison du CMH de classe I présentant un peptide étranger, des signaux de co-stimulation et un signal généré par la liaison de l'IL-2 à son récepteur. Une cellule dendritique activée, possédant des molécules de co-stimulation, peut directement activer un lymphocyte T CD8⁺. La cellule T CD8⁺ peut alors sécréter de l'IL-2

et induire sa propre activation et différenciation. Dans la plupart des cas, l'IL-2 est produite par les lymphocytes CD4⁺ activés, dû à la co-stimulation inadéquate par la CPA (Janeway et al. 2001).

Lorsqu'un CTL activé rencontre une cellule présentant un peptide étranger reconnu par son RcT, elle relâche des substances, comprises dans des granules dans le cytoplasme, pour lyser et tuer cette cellule. Les CTL sont efficaces pour éliminer les cellules infectées par des virus ou des parasites, inaccessibles par les anticorps. Les CTL sont aussi importantes pour le rejet de greffes allogéniques. La lyse cellulaire médiée par les CTL est produite par le relâchement de substances cytotoxiques contenues dans des granules. Ces substances incluent la perforine, qui perce la membrane des cellules cibles, et le granzyme B, qui induit l'apoptose de la cellule cible (Abbas et al. 1991).

Le relâchement de granules cytolitiques par les CTL est le moyen le plus employé par les CTL, mais deux autres mécanismes apoptotiques peuvent aussi être utilisés. Les CTL expriment Fas ligand (FasL) et l'engagement Fas-FasL provoque l'activation des caspases et induit l'apoptose de la cellule cible. Un CTL sécrète aussi certaines cytokines, comme l'INF- γ (interféron- γ), le TNF- α et le TNF- β . L'INF- γ inhibe directement la réplication virale et induit l'expression de CMH de classe I et II. Cette cytokine active aussi les macrophages et les recrute au site d'activation. Les TNF synergisent avec l'INF- γ pour l'activation des macrophages (Janeway et al. 2001).

3.2.3.3 Activation des lymphocytes B

Les lymphocytes B reconnaissent les antigènes à l'aide de leur récepteur (RcB), qui est constitué, entre autres, d'une immunoglobuline. Les cellules B captent les antigènes circulants, et n'ont pas nécessairement besoin de présentation d'antigène par les CMH. L'activation de lymphocytes B par des antigènes protéiques nécessite la coopération des cellules T CD4⁺. Suite à la captation de protéines solubles par le RcB, les lymphocytes B internalisent ce complexe où l'antigène sera dégradé et présenté par les CMH de classe II. Les cellules T CD4⁺ reconnaissant le peptide étranger, par leur RcT, présenté par les CMH II sur le lymphocyte B, reçoivent aussi les signaux de co-stimulation CD154-CD40 et sécrètent l'IL-4 et l'IL-5, qui sont nécessaires à l'activation complète des lymphocytes B. Le

lymphocyte B reçoit aussi un signal par son CD40, ce qui contribue à son activation. L'interaction avec le CD40 et la sécrétion de cytokines contribue aussi au changement d'isotype des immunoglobulines. D'autres types d'antigènes, comme les lipopolysaccharides, induisent l'activation des lymphocytes B en liant plusieurs récepteurs sur la même cellule. Ce type d'antigène n'induit pas de réponse par les cellules CD4⁺, ce qui empêche la formation de cellules B mémoires et ne produit que des anticorps de type IgM. Les lymphocytes B activés se divisent rapidement et se différencient en plasmocytes, cellules productrices d'anticorps (Benjamini et al. 1996; Janeway et al. 2001).

3.2.3.4 Absence de co-stimulation : anergie

Lorsqu'un lymphocyte T naïf reconnaît un antigène par son RcT en absence de signaux de co-stimulation, ce lymphocyte s'inactive et entre en état d'anergie. Le lymphocyte anergisé devient alors incapable de produire de l'IL-2 et est réfractaire à toute restimulation par le même antigène. Ce phénomène assure la tolérance des lymphocytes T aux antigènes du soi (Janeway et al. 2001).

3.2.3.5 Signalisation intracellulaire lymphocytaire

L'activation lymphocytaire est un processus complexe et extrêmement régulé, pour éviter des activations inutiles qui pourraient être dommageables à l'individu. Plusieurs voies intracellulaires complexes et reliées entre elles sont nécessaires pour activer un lymphocyte. Le sujet discuté ici n'est pas entièrement nécessaire à la compréhension de cette thèse, c'est pourquoi, les voies de signalisations seront décrites brièvement.

Lorsqu'un RcT et les molécules CD4 ou CD8 s'engagent avec un CMH présentant un peptide étranger, le complexe CD3 transduit trois types de signaux activateurs, qui sont reliés entre eux et nécessaires pour stimuler le lymphocyte : (1) la phosphorylation de protéines membranaires et cytoplasmiques, (2) l'hydrolyse de phospholipides inositol de la membrane plasmique, et (3) l'augmentation de la concentration du calcium cytoplasmique (Benjamini et al. 1996). Tous ces signaux stimulent la synthèse protéique ou la transcription de gènes par des cascades complexes (Figure 3.9). Ces signaux intracellulaires peuvent induire plusieurs conséquences : la prolifération, la différenciation, l'activation,

l'apoptose ou l'anergie. La signalisation par un RcT ou un RcB est similaire et les détails décrits plus bas s'appliquent généralement aux deux types lymphocytaires.

La signalisation intracellulaire, causée par la dimérisation et l'oligomérisation du récepteur, est initialement induite par l'activation de protéines tyrosine kinases (PTK) cytoplasmiques non-associées aux récepteurs. Les portions intracellulaires des molécules CD3 possèdent des ITAM (« immunorécepteur tyrosine-based activation motif »). Ces ITAM servent de substrat aux PTK, permettant le recrutement de molécules signalétiques supplémentaires via les domaines SH2 (« Src homology 2 »). La protéine tyrosine phosphatase retrouvée sur la portion intracellulaire du CD45 peut réguler positivement les signaux d'activation en déphosphorylant les motifs inhibiteurs des PTK. Les PTK des familles Src (Lck et Fyn) et Syk/ZAP-70 sont impliquées dans la transduction de signaux par le RcT. Les PTK de la famille Src possèdent des domaines d'activation et d'inactivation régulés par phosphorylation et déphosphorylation. L'activation d'un lymphocyte nécessite environ 100 interactions RcT/co-récepteur-CMH avec une CPA. En absence de co-récepteur, 10 000 interactions sont nécessaires, représentant environ 10% des CMH à la surface d'une cellule. Donc, lors d'une liaison RcT/co-récepteur-peptide-CMH, Lck et Fyn phosphorylent les ITAM et ZAP-70 est recruté par les ITAM phosphorylés. Ensuite ZAP-70 agit sur LAT (« linker activation in T cells ») et la protéine SLP-76. Par ses multiples résidus tyrosine, SLP-76 est capable de recruter d'autres protéines par leurs domaines SH2, ce qui poursuit le signal à Tec kinases, PLC- γ (phospholipase C- γ) et Ras. PLC- γ et Ras initient trois voies d'activation importantes qui aboutissent en l'activation de facteurs de transcription au noyau. NF κ B, NFAT et AP-1, sont des facteurs de transcriptions qui génèrent la transcription de nouveaux gènes (Janeway et al. 2001).

La PLC- γ a un rôle crucial dans l'amplification du signal. Cette enzyme sous forme active scinde les molécules de la membrane phospholipidique PIP₂ (phosphatidylinositol biphosphate) en deux parties : IP₃ (inositol triphosphate) et DAG (diacylglycerol). L'IP₃, en interagissant avec son récepteur sur le réticulum endoplasmique, cause le relâchement d'ions calciques (Ca²⁺) en grande quantité. L'augmentation du calcium intracellulaire active la calmoduline, qui à son tour, active d'autres protéines et enzymes, jusqu'à l'activation du facteur de transcription NFAT (Janeway et al. 2001).

Le DAG pour sa part, reste associé à la surface interne de la membrane plasmique. Le DAG active les membres de la famille des protéines kinases C (PKC). Ces sérine-thréonine protéines kinases initient plusieurs voies d'activations du facteur de transcription NFκB (Janeway et al. 2001).

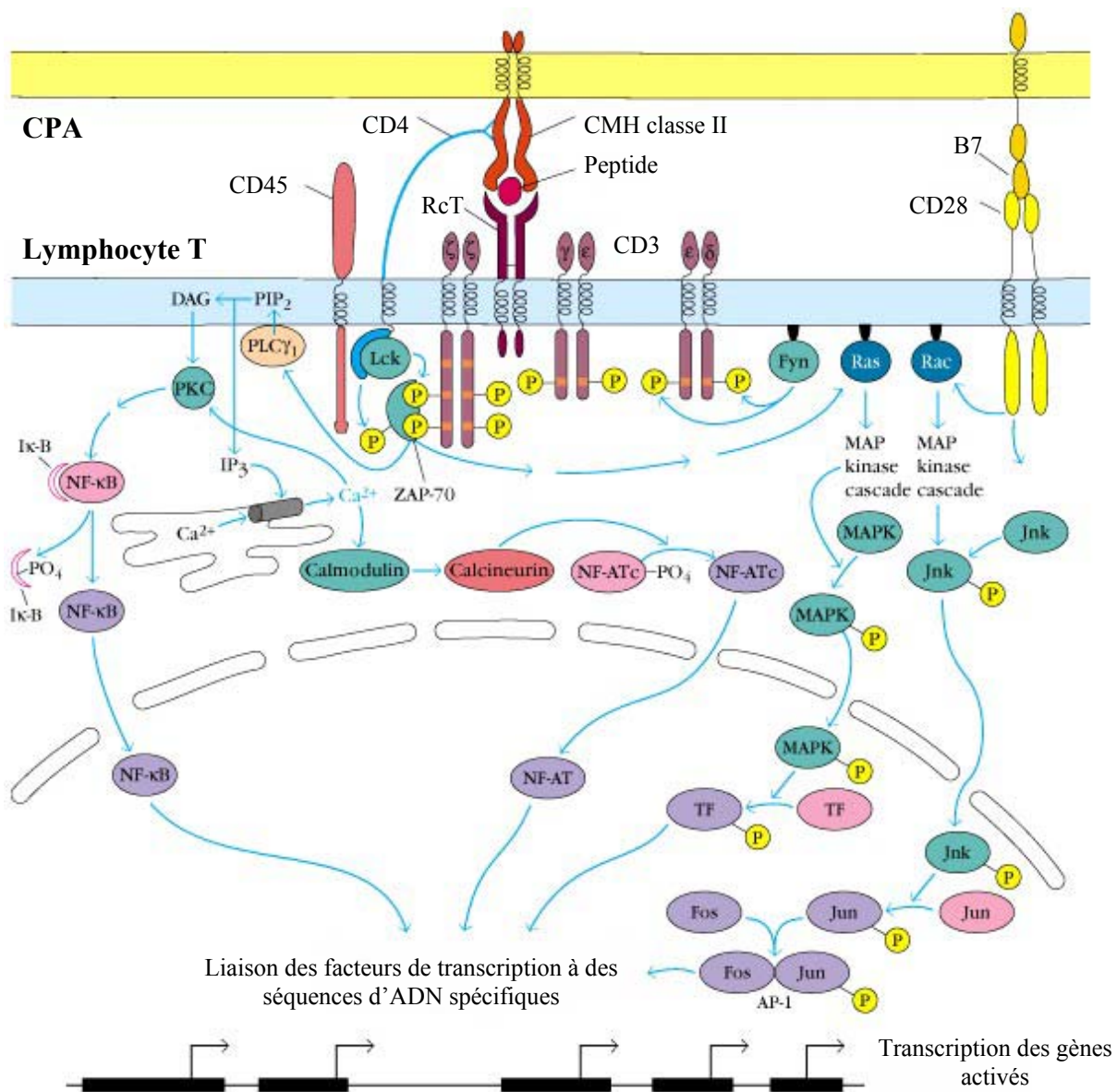


Figure 3.9 : Résumé schématique des signaux d'activation intracellulaire des lymphocytes T CD4+.

(Goldsby et al. 2000)

Chapitre 4. Transplantation et tolérance immunologique

La tolérance se définit comme l'absence de réactivité immunitaire destructrice envers des antigènes spécifiques étrangers. D'un point de vue de l'immunologiste de la transplantation, cet état d'insensibilité est, en quelque sorte, la quête du Saint Graal. L'induction de tolérance permet la transplantation d'organes ou de cellules, provenant d'un individu différent, sans l'emploi d'immunosuppresseurs, tout en maintenant l'immunocompétence de l'hôte. Théoriquement, l'acceptation des greffons pourrait perdurer tout au long de la vie du patient. Les immunosuppresseurs permettent la survie des organes greffés, mais s'accompagnent d'effets indésirables importants, qui seraient évités par la tolérance. Dans ce chapitre, nous verrons, en premier lieu, les différents types de transplantation, les aspects du rejet de greffe immunitaire et nous terminerons par les différents protocoles d'induction de tolérance et leurs mécanismes.

4.1 Les différents types de transplantation

La transplantation de tissus, d'organes ou de cellules peut s'effectuer entre individus différents. On distingue plusieurs types de transplantation selon l'espèce et la provenance des tissus greffés et des receveurs (Benjamini et al. 1996):

- 1- **Autogreffe:** Le donneur et le receveur sont le même individu. Les tissus transplantés ne sont pas rejetés.
- 2- **Isogreffe:** Transplantation de tissu entre individus identiques génétiquement. Ce type de greffe peut s'effectuer chez l'humain, lorsque les sujets sont des jumeaux identiques, ou chez les animaux, lorsqu'on est en présence de souches congéniques. Les CMH de ces individus sont identiques et il n'y a pas de rejet immunitaire.
- 3- **Allogreffe:** L'allogreffe consiste en la transplantation de tissus entre individus non-identiques, appartenant à une même espèce. Dans la plupart des cas, ces tissus

transplantés seront rejetés par le système immunitaire à cause des polymorphismes des CMH et d'autres antigènes mineurs.

- 4- **Xénogreffe:** Transplantation entre individus d'espèces différentes, comme la transplantation de cœur de porc ou de singe chez un humain. Ce type de greffe est rejeté très rapidement.

L'utilisation d'immunosuppresseurs est nécessaire dans les cas d'allogreffes et de xénogreffes. Malgré une immunosuppression efficace et soutenue, il est important que le donneur et le receveur soient les plus compatibles possibles, i.e. une similarité accrue au niveau des antigènes majeurs, pour que le tissu greffé puisse survivre à long terme.

4.2 Les aspects du rejet de greffe

4.2.1 Mécanismes impliqués dans le rejet de greffe

Le rejet des greffes est médié principalement par une réponse immune cellulaire contre les antigènes allogéniques (CMH principalement) exprimés sur les cellules du greffon. Le rejet peut être divisé en deux phases : la phase de sensibilisation, dans laquelle les lymphocytes réagissant contre les antigènes du donneur s'activent et prolifèrent, et la phase effectrice, dans laquelle la destruction du tissu greffé prend place.

4.2.1.1 Phase de sensibilisation

Pendant la phase de sensibilisation, les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ s'activent et prolifèrent suite à la présentation des antigènes allogéniques. Les antigènes d'histocompatibilité majeurs et mineurs sont impliqués. En règle générale, la réponse immune à des antigènes mineurs est plus faible. La présentation des alloantigènes peut s'effectuer par les cellules du donneur et/ou les cellules de l'hôte, déterminant une présentation directe ou indirecte respectivement (Goldsby et al. 2000).

4.2.1.1.1 La présentation directe

La majorité des tissus greffés contiennent des leucocytes passagers. Ces leucocytes sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) exprimant les CMH du donneur. Suite à la greffe, ces CPA migrent aux nœuds lymphatiques ou autres organes lymphoïdes

secondaires, où elles activeront les cellules T CD4⁺ « helper » (T_H). Ces CPA doivent aussi fournir les signaux de co-stimulation nécessaires à l'activation des lymphocytes. Comme mentionné au Chapitre 3, les T_H ont un rôle prédominant dans l'orchestration et l'amplification d'une réponse immune. Les cellules T_H reconnaîtront à la fois les CMH du donneur comme étant étrangers ainsi que le peptide présenté par ces CMH. Étant donné la plus grande proportion de cellules T_H qui seront activées par des CMH étrangers, la réponse immune en sera aussi décuplée. Les cellules dendritiques se retrouvent dans la plupart des tissus, et sont reconnus comme étant des CPA professionnelles (expriment de manière constitutive le CMH de classe II et fournissent les signaux de co-stimulation), ce qui les promeut au rang des principales actrices dans la présentation directe. Il est suggéré que les myoblastes peuvent servir de CPA pour activer directement le système immunitaire suite à leur transplantation (Goebels et al. 1992; Garlepp et al. 1995; Curnow et al. 2001), cependant aucune évidence de leur migration au niveau des organes lymphoïdes secondaires ou de leur rôle dans l'activation des lymphocytes *in vivo* n'a été démontré.

4.2.1.1.2 La présentation indirecte

Lors d'une greffe de tissus ou de cellules, des bris tissulaires sont nécessaires à l'implantation du greffon, ce qui entraîne la phagocytose de protéines allogéniques par les CPA du receveur. Ces CPA vont ensuite migrer aux organes lymphoïdes secondaires pour les présenter aux cellules T_H via leur CMH du donneur pour les activer.

4.2.1.2 La phase effectrice

Une variété de mécanismes est impliquée lors de la phase effectrice du rejet. Les réactions cellulaires les plus communes comprennent les réactions d'hypersensibilité retardée (« delayed-type hypersensitivity ») et la cytotoxicité induite par les CTL (Figure 4.1). Les réactions d'hypersensibilité retardée sont causées par la sécrétion de certaines cytokines par les T_H qui induisent une forte réaction inflammatoire localisée. Cette réaction est caractérisée par un influx massif de cellules inflammatoires, dont les macrophages sont les principaux intervenants, provoquant donc le dommage au tissu greffé. Les CTL sont, pour leur part, principalement des cellules T CD8⁺, restreintes aux CMH de classe I, mais parfois aussi des cellules T CD4⁺, restreintes aux CMH de classe II. Suite à leur activation

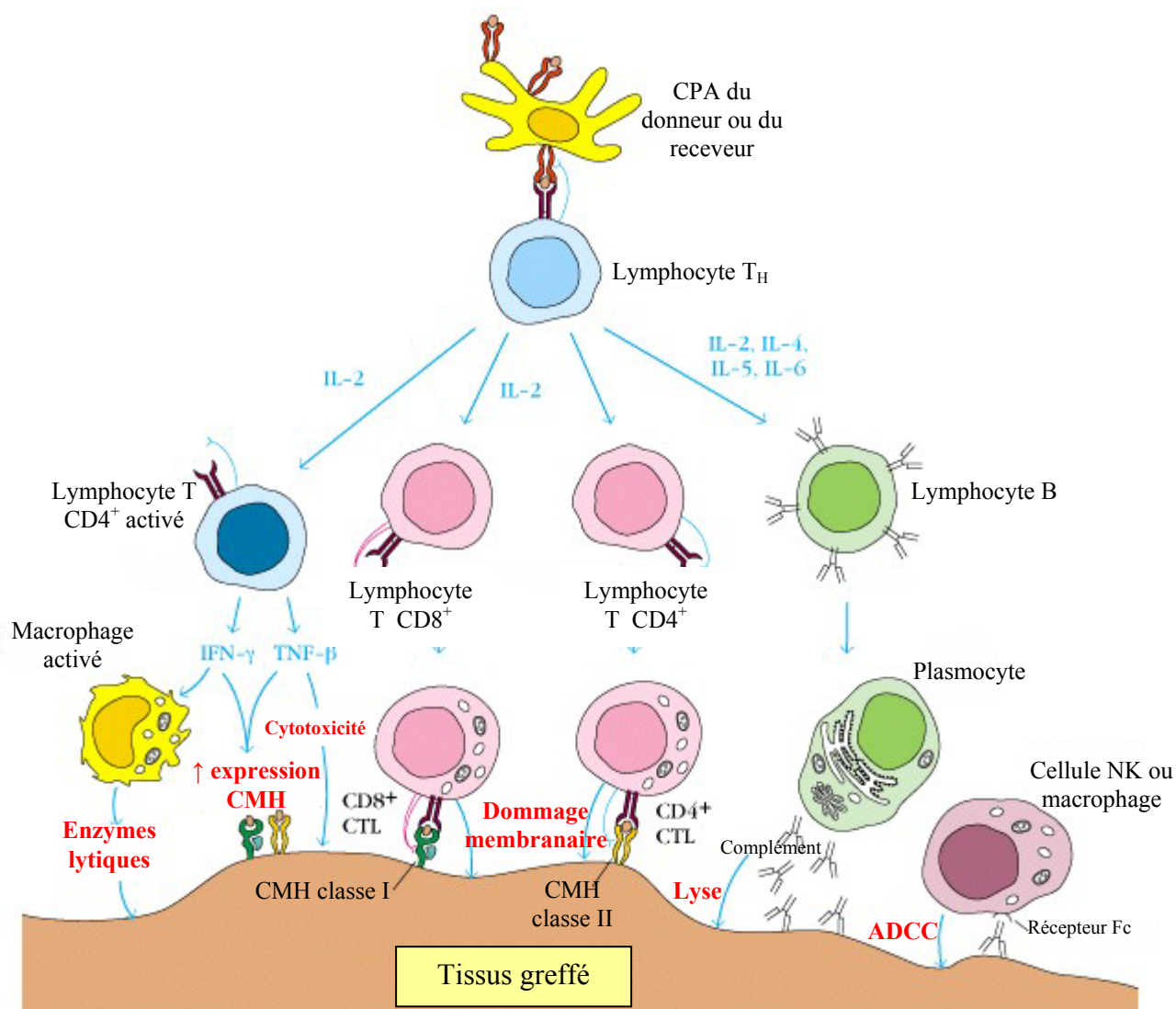


Figure 4.1 : Représentation schématique des mécanismes de rejet de greffes.

Parmi ceux-ci, notons les réactions d'hypersensibilité retardée (« delayed-type hypersensitivity »), la cytotoxicité induite par les CTL, la lyse par le complexe anticorps-complément et l'ADCC (« antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity »).

(Goldsby et al. 2000)

spécifique par les CPA du donneur ou du receveur, ainsi que par les T_H , les CTL prolifèrent et migrent dans la circulation pour trouver leur cible. Lorsqu'un CTL reconnaît sa cible en reliant son TCR avec le CMH de classe I des cellules du greffon, il détruit cette dernière soit en induisant l'apoptose par Fas, soit en relâchant des enzymes (perforine et granzyme) qui percent la membrane et fragmentent l'ADN. Le meilleur moyen pour vérifier si un tissu greffé est en processus de rejet est d'effectuer une biopsie et de vérifier la présence de lymphocytes infiltrants par immunohistochimie.

Des mécanismes moins communs de la phase effectrice de rejet sont la lyse par le complexe anticorps-complément et l'ADCC (« antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity ») (Figure 4.1). Lorsque des anticorps spécifiques aux peptides antigéniques du greffon sont produits par les lymphocytes B, ils se retrouvent dans la circulation sanguine, cherchant leur cible. Les anticorps fixés à la surface des cellules du donneur peuvent, selon leur isotype, activer la cascade du complément, menant à la lyse de la cellule cible. Lors de l'ADCC, les anticorps liés à leur cible activent certaines cellules cytotoxiques via leur récepteur de la région Fc des immunoglobulines. Les cellules possédant ce récepteur sont les cellules NK, les macrophages, les monocytes, les neutrophiles et les éosinophiles. La majorité de ces cellules lysent leur cible en relâchant des enzymes cytolytiques ou en sécrétant le TNF (« Tumor necrosis factor »).

4.2.2 Les types de rejet

On distingue trois types de rejet immunitaire suite à une greffe: le rejet hyperaigu, aigu et chronique.

4.2.2.1 Le rejet hyperaigu

Le rejet hyperaigu est généralement causé par la fixation d'anticorps circulants et préformés (anticorps réagissant contre les antigènes du greffon) sur le tissu transplanté, causant ainsi une forte réaction inflammatoire et une forte coagulation du sang en quelques minutes à quelques heures suivant la transplantation (Schwartz 1994). Ce type de rejet se produit lors de transplantations d'organes solides. Les antigènes causant ce type de réaction sont les antigènes des groupes sanguins et les CMH qui ont déjà été mis en présence du

système immunitaire du receveur pendant une grossesse, une transfusion ou une greffe. Les xénogreffes génèrent aussi un rejet hyperaigu, causé par la présence d'anticorps circulants naturels dirigés contre les antigènes provenant d'autres espèces. Les tests préventifs sont aujourd'hui le meilleur moyen pour contrer ce type de rejet.

4.2.2.2 Le rejet aigu

Le rejet aigu est causé par le développement de réponses cellulaires et humorales spécifiques qui surviennent environ une semaine suivant la transplantation. C'est durant cette période que l'emploi d'immunosuppresseurs devient essentiel pour permettre la survie du greffon. En absence d'immunosuppression, le tissu greffé est infiltré de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, ainsi que d'autres leucocytes, et on détecte aussi la présence d'allo-anticorps circulants. Ces phénomènes mènent à la destruction du tissu greffé.

4.2.2.3 Le rejet chronique

Si le tissu greffé survit au rejet hyperaigu et aigu, une période de quiétude s'installe. Cette période peut durer plusieurs années où les fonctions du greffon apparaissent normales. C'est pendant cette période que le rejet chronique peut survenir. Il n'existe aucun médicament à ce jour permettant de contrer ce phénomène qui se produit chez 50% des patients transplantés (Hayry et al. 1993). Le rejet chronique est caractérisé par une occlusion lente et constante des artères, des veines et des autres structures tubulaires du tissu greffé. Durant une certaine période, cette occlusion est compensée par d'autres phénomènes physiologiques, dont le développement ne peut être décelé. Cependant, l'occlusion vasculaire atteint un point critique, causant ainsi une ischémie menant à la nécrose et la fibrose tissulaire. Les causes du rejet chronique ne sont pas encore connues, mais il existe un lien entre le développement d'un rejet aigu et le rejet chronique.

4.2.3 GVHD

Dans le cas de greffe de moelle osseuse, la situation inverse peut se produire. C'est-à-dire que ce n'est pas l'hôte qui rejette le greffon, mais le greffon qui rejette l'hôte. En effet la présence de lymphocyte T matures contaminant les cellules de moelle osseuse d'un donneur peuvent s'activer contre les CMH du receveur et engendrer des sévères réactions

inflammatoires, appelées GVHD (« graft-versus-host disease »). Les effets se reflètent par des éruptions cutanées, des diarrhées et des inflammations pulmonaires. Ces réactions peuvent se produire non seulement en cas de disparité des CMH de classe I et II, mais aussi des antigènes mineurs. Les GVHD sont une complication commune des situations de greffe de moelle osseuse, et elles peuvent être contrôlées par élimination préalable des lymphocytes T des cellules de moelle greffée et par administration d'immunosuppresseurs pendant une courte période suivant la greffe de moelle (Janeway et al. 2001).

4.2.4 Les immunosuppresseurs

L'emploi d'immunosuppresseurs permet aujourd'hui la survie de milliers de greffes à travers le monde. Malgré le développement de nouvelles formulations chimiques d'immunosuppresseurs de plus en plus efficaces pour contrôler le rejet cellulaire, leur usage s'accompagne indéniablement d'effets secondaires néfastes. En effet, les patients sous traitement immunosuppresseur sont plus sujets aux infections et au développement de cancer, puisque tout leur système de défense est déprimé, dû à l'action non-spécifique de ces drogues. De plus, l'emploi de certains immunosuppresseurs peut être néphrotoxique et neurotoxique (McCauley 1993; Wijdicks et al. 1994; Klintmalm et al. 1995; Neu et al. 1997; Philip et al. 1998).

Dans le but d'augmenter la spécificité de l'immunosuppression, certains anticorps monoclonaux ou polyclonaux ont été développés. La plupart sont dirigés contre des récepteurs sur les lymphocytes. Les anticorps polyclonaux sont dirigés contre des lymphocytes humains, comme l'ATGAM (« antithymocyte globulin ») et la thymoglobine. Ces deux anticorps polyclonaux ont été produits chez le cheval (ATGAM) et chez le lapin (thymoglobulin) par immunisation avec des thymocytes humains. Après leur administration, ces anticorps provoquent la chute du nombre de lymphocytes totaux, mais particulièrement des lymphocytes T. Ces anticorps sont surtout utilisés lors d'épisodes de rejet aigu. Par contre, leur emploi est associé à des effets secondaires importants comme des réactions allergiques et un risqué élevé d'infections.

Les anticorps monoclonaux ont été initialement testés en utilisant des anticorps complets de souris. Le plus répandu est l'OKT3 (anti-CD3). Après injection, la quantité de

lymphocytes circulants chute sous les 5%. Cet anticorps est aussi surtout utilisé lors d'épisodes de rejet aigu, lorsque les patients deviennent résistants aux immunosuppresseurs stéroïdiens. Cet anticorps ne reste que quelques jours en circulation, puisque le patient produit des anticorps contre les immunoglobulines de souris. Son utilisation est aussi associée aux effets indésirables de l'immunosuppression (risque d'infection et de développement de cancer) et aux effets indésirables dus à sa nature (fièvre, frissons, œdème pulmonaire et néphrotoxicité). Un autre anticorps monoclonal est l'anti-récepteur à l'IL-2 (IL-2R). Cet anticorps a la particularité qu'il a été humanisé. À partir d'un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'IL-2R humain, seules les parties liant l'antigène (CDR) sont préservées et insérées dans un gène produisant un anticorps humain. Cette humanisation permet à l'anticorps de perdurer plusieurs mois dans un organisme humain. Deux anti-IL-2R humanisés ont été développés : daclizumab et basiliximab. Ces agents induisent une immunosuppression et ont été démontrés efficaces pour réduire l'incidence de rejet aigu (Cosimi 1995). Leur utilisation offre l'avantage de ne pas causer d'effets indésirables dus à leur nature. D'autres anticorps monoclonaux humanisés sont en essais cliniques et pourraient être appliqués à la prévention du rejet de greffe : CAMPATH 1H et CAMPATH 3 (anti-CD52), hOKT3 γ 1, anti-LFA-1 (bloque l'interaction LFA-1:ICAM-1), CTLA4-Ig (seconde génération), hu5C8 et IDEC131 (anti-CD154), anti-CD45RB, et h1F1 (anti-B7.1; CD80) et h3D1 (anti-B7.2; CD86) (Vincenti 2002).

Un fait important à noter est l'échec d'essais cliniques de l'utilisation du hu5C8 (anti-CD154) par la compagnie Biogen (Kawai et al. 2000) après qu'un patient soit décédé de complications thromboemboliques. En plus, l'utilisation du hu5C8 n'a pas démontré une immunosuppression efficace (5 patients sur 7 ont eu des épisodes de rejet).

4.3 L'induction de tolérance

L'induction de tolérance a été mise à jour par les travaux pionniers de Owen, Medawar et autres au début des années 1950. Depuis, l'évolution scientifique et technologique a permis de mieux comprendre le système immunologique et le phénomène de tolérance. On distingue aujourd'hui deux types de tolérance : la tolérance périphérique et la tolérance centrale. Plusieurs mécanismes sont impliqués et sont décrits aux points

suivants. Par la suite, nous effectuerons un survol des protocoles développés chez les modèles animaux menant à l'induction de tolérance périphérique et centrale. La description des protocoles de tolérance se concentrera principalement sur l'utilisation d'agents bloquant les interactions entre les molécules importantes pour l'activation lymphocytaires.

4.3.1 Mécanismes de tolérance immunologique

4.3.1.1 Délétion clonale

La délétion clonale implique l'élimination des lymphocytes allo-réactifs (réagissant contre les antigènes du donneur). Ce mécanisme est envisagé comme un moyen très efficace pour obtenir un état de tolérance durable (Wells et al. 2001). Cette délétion peut survenir au niveau du thymus (délétion centrale), suite à une greffe de moelle osseuse, ou au niveau périphérique (délétion périphérique), dans les tissus lymphoïdes secondaires.

Suite à une greffe de moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques se différencient en plusieurs lignées cellulaires, dont des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Ces CPA migrent au thymus et serviront à la sélection thymique des lymphocytes T originant de la greffe de moelle. Les lymphocytes néo-formés seront donc tolérants envers les CMH du donneur et du receveur, puisque les lymphocytes réagissant fortement contre ces CMH, seront délétés par sélection négative. La délétion thymique a aussi été observée lors d'injections intrathymiques de peptides de CMH du donneur (Markmann et al. 1993; Jones, N. D. et al. 1997; Jones, N. D. et al. 1998). Contrairement à une greffe de moelle osseuse, la délétion des lymphocytes réactifs est transitoire et est dépendante de la persistance au thymus des peptides des CMH.

La délétion des lymphocytes allo-réactifs en périphérie est un phénomène très important pour le développement de tolérance (Li et al. 1999; Wells et al. 1999). Ce phénomène a été observé dans les cas d'injection intraveineuse ou orale d'une quantité massive d'antigènes définis (Kearney et al. 1994; Weiner 1997), ou dans les cas d'agents modulateurs des lymphocytes T, comme l'inhibition des fonctions accessoires ou des molécules de co-stimulation nécessaires à leur activation (Qin, S. X. et al. 1989; Pearson et al. 1992; Li et al. 1999; Wells et al. 1999). Différents sous mécanismes opèrent lors de

délétions périphériques : la mort cellulaire passive, et la mort cellulaire active. Dans ces deux cas, les cellules meurent par apoptose, mais utilisent des voies induction différentes. La mort passive s'effectue par absence de facteurs de croissance. Ce phénomène permet le maintien de l'homéostasie lors d'infections, ne requiert pas l'interaction avec Fas ou le récepteur du TNF (« Tumor necrosis factor »; TNFR) et résulte de l'absence de sécrétion d'IL-2 et d'expression de gènes anti-apoptotiques (Sayegh et al. 1998; Van Parijs et al. 1998). La mort cellulaire active, pour sa part, se produit lors d'une stimulation répétée par les récepteurs des lymphocytes T et est médiée par des signaux transduits par Fas et TNFR. Ce phénomène a été démontré indépendant d'une co-stimulation par CD28. Contrairement à la mort passive, la mort active requière la présence de l'IL-2 et est indépendante de l'expression de Bcl-2 ou Bcl-xL (gènes anti-apoptotiques) (Van Parijs et al. 1998).

L'importance du rôle de la mort cellulaire passive pour l'induction de tolérance à la transplantation a été démontrée par l'utilisation de souris transgénique exprimant constitutivement le gène Bcl-xL dans les lymphocytes T (Wells et al. 1999). Ces souris ont démontré une résistance à l'induction de tolérance en utilisant un protocole bloquant des signaux de co-stimulation, efficace chez les souris sauvages. La mort cellulaire active a aussi son rôle lors de l'induction de tolérance à la transplantation. Par exemple, la présence de l'IL-2 est requise lors l'induction de tolérance à des transplantations allogéniques (Dai et al. 1998; Wells et al. 1999). En effet, en utilisant un protocole d'induction de tolérance bloquant les signaux de co-stimulation et en effectuant des transplantations allogéniques chez des souris déficientes en IL-2, la survie des greffes à long terme échoue. En plus, le rôle de l'IL-2 a aussi été démontré dans un autre modèle utilisant des inhibiteurs de la calcineurine, utilisés comme immunosuppresseurs. La Cyclosporine A et le FK506 agissent tous deux comme inhibiteurs de la calcineurine, inhibant ainsi la production d'IL-2. L'ajout d'un de ces deux immunosuppresseurs à un protocole de tolérance efficace impliquant le blocage des signaux de co-stimulations abrège la survie des greffes (Larsen et al. 1996b; Li et al. 1999). Ces résultats démontrent que la mort cellulaire passive et active jouent un rôle important dans l'induction de tolérance.

4.3.1.2 Anergie clonale

L'anergie se définit comme un état où un lymphocyte T devient réfractaire à une re-stimulation antigénique (Lechler et al. 2001). La démonstration de cet état a surtout été faite *in vitro*, mais récemment, des études *in vivo* ont démontré un lien entre l'anergie et le phénomène d'immunorégulation/suppression décrit au point suivant (Chai et al. 1999). Suite à une anergie, les lymphocytes ont une durée de vie plus courte et meurent par apoptose.

4.3.1.3 Régulation/suppression

Malgré la délétion des clones des lymphocytes T allo-réactifs lors d'une greffe, cet unique mécanisme ne pourrait expliquer la survie à long terme du greffon à l'aide d'un protocole d'induction de tolérance, puisque cette délétion n'est pas complète. Un apport important au phénomène de tolérance, et toujours sous étude intensive, a été démontré par des lymphocytes T appelés régulateurs (Treg). L'immunorégulation par les lymphocytes T est un des mécanismes principaux responsables du maintien de l'homéostasie des lymphocytes T et de la tolérance envers des antigènes spécifiques (Francois Bach 2003). Ce mécanisme est utilisé, non seulement pour contrôler les réponses immunes envers le soi, prévenant ainsi les réactions autoimmunes, mais aussi pour contrôler les réponses immunes envers des antigènes étrangers, comme dans les cas de transplantation.

La plupart des études effectuées chez les humains et les rongeurs ont démontré une activité immunorégulatrice des lymphocytes T CD4⁺ (Wood, K. J. et al. 2003). Par contre, cette même propriété a aussi été démontrée lors de transplantations par des lymphocytes CD8⁺ (Hutchinson 1986; Zhou et al. 2001; Gilliet et al. 2002), des lymphocytes CD8⁺CD28⁻ (Ciubotariu et al. 1998), des lymphocytes RcT⁺CD4⁻CD8⁻ (double négatif) (Zhang et al. 2000) et des cellules NK (« natural killer ») (Zeng et al. 1999; Seino et al. 2001). L'identification de marqueurs définitifs sur les Treg est encore en processus, mais il semble que l'isolement de cellules T CD4⁺CD25⁺ (sous-unité α du récepteur de l'IL-2) soit probablement la voie la plus utile pour séparer les lymphocytes ayant une activité régulatrice (Sakaguchi et al. 1995; Shevach 2001). La liste des marqueurs candidats permettant l'identification des Treg s'allonge continuellement et inclut l'expression de CD45RB^{low} (Hara et al. 2001), CTLA-4 (« cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 »; CD152)

(Kingsley et al. 2002), CD62L (L-sélectine) (Herbelin et al. 1998), GITR (« glucocorticoid-induced tumor-necrosis factor receptor ») (Zelenika et al. 2002), CD122 (chez les cellules humaines seulement) (Levings et al. 2001), CD103 (Zelenika et al. 2002) et le facteur de transcription FOXP3 (Hori et al. 2003). Cependant, aucune molécule ou gène ne permet de remplir les critères d'exclusivité et de stabilité.

L'efficacité des Treg lors de transplantations a été démontrée par Hall *et al.* en 1990 par le transfert de cellules CD4⁺CD25⁺ causant le prolongement de la survie de greffes cardiaques (Hall et al. 1990). Ces cellules avaient été prélevées de greffes de cœur ayant survécus à long terme sous immunosuppression à la Cyclosporine A. Par la suite, le groupe de Waldmann a démontré que l'utilisation d'un anti-CD4 non-déplétant permettait de transférer la tolérance envers des greffes de cœur chez la souris à une souris naïve (phénomène appelé tolérance infectieuse) (Qin, S. et al. 1993). Ce groupe a aussi démontré que la présence de ces cellules se réduisait à quelques semaines suivant la transplantation, que ces cellules dépendaient de la présence des alloantigènes (Waldmann et al. 2001a) et qu'elles étaient retrouvées principalement dans le greffon (Graca et al. 2002). En plus, la présence de cellules Treg permet d'inhiber les GVHD lors de greffes de moelle osseuse (Taylor, P. A. et al. 2001; Cohen, J. L. et al. 2002; Hoffmann et al. 2002).

Le mécanisme exact par lequel les Treg agissent est encore sous investigation. Plusieurs hypothèses ont été émises et restent encore controversées. Premièrement, les Treg nécessitent un contact cellule-cellule *in vitro* pour effectuer leur effet puisque l'engagement avec le CTLA-4 exprimé sur les Treg augmente leur potentialité (Kingsley et al. 2002). En plus, la présence de IL-10 (Hara et al. 2001), de même que le TGF- β (« tumor growth factor β ») (Josien et al. 1998), permet de maintenir l'activité suppressive *in vivo*. Finalement, l'engagement du GITR sur les Treg inhibe leur activité suppressive et augmente leur activité effectrice (Wood, K. J. et al. 2003).

4.3.2 Protocoles expérimentaux de tolérance périphérique

En modulant le système immunitaire périphérique, i.e. les cellules présentes dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions, etc.), il est possible d'induire un état de tolérance. La modulation périphérique implique des mécanismes de délétion, d'anergie

clonale et de régulation (Dong et al. 1999). Plusieurs protocoles ont été développés et testés chez les rongeurs et chez les primates. Les protocoles d'induction de tolérance consistent généralement en un court traitement au moment de la greffe, permettant son acceptation à long terme. Nous allons nous concentrer sur les protocoles de tolérance utilisant des anticorps monoclonaux non-déplétants, puisque ces anticorps agissent sur les lymphocytes réactifs aux alloantigènes, donc plus spécifiques. Un intérêt scientifique grandissant s'est développé dans ce domaine et de nombreux anticorps monoclonaux ont été développés. D'autres aspects ont aussi été considérés, dont l'âge des animaux et la disparité antigénique. Les animaux utilisés doivent avoir atteint l'âge adulte et les donneurs et receveurs doivent être de CMH différents. Le tableau 4.1 résume les différents protocoles de tolérance périphérique chez les rongeurs utilisant des anticorps monoclonaux non-déplétants.

4.3.2.1 Blocage des co-récepteurs

Cette avenue a été initialement entreprise par l'utilisation de l'anti-CD4 et de l'anti-CD8 qui ont démontré la survie à long terme d'allogreffes de cœur et la survie de greffe de peau différentes par des antigènes mineurs (Chen et al. 1992; Cobbold et al. 1996). L'utilisation de ces anticorps non-déplétants a permis de démontrer la tolérance infectieuse décrite au point 4.3.1.3 (Qin, S. et al. 1993). Peu d'utilisations de ces anticorps ont été entreprises en dehors du groupe de H. Waldmann, probablement dû à l'engouement général envers les anticorps bloquant les signaux de co-stimulation. En plus, l'état de tolérance s'acquiert seulement après plusieurs semaines de traitement (Waldmann et al. 2001b).

4.3.2.2 Blocage de la co-stimulation

Le développement d'anticorps ou de molécules permettant le blocage des signaux de co-stimulation des lymphocytes T ont fait leur apparition et apparaissent comme la voie la plus prometteuse.

Le blocage de l'interaction CD28 :B7 (CD80 et CD86) peut s'effectuer à l'aide du CTLA4-Ig. Le CTLA4-Ig est une protéine recombinante résultant de la fusion entre le domaine extracellulaire du CTLA-4 et de la partie constante (Fc) d'une IgG. Son emploi a été initialement démontré efficace *in vitro*, où une interaction CMH :RcT, en absence de

signal de co-stimulation CD28, résulte en une anergie des lymphocytes T (Tan et al. 1993). Par contre le CTLA4-Ig bloque aussi l'interaction CTLA-4 :B7, qui normalement induit un signal négatif aux lymphocytes T. L'injection systémique de CTLA4-Ig a été démontrée efficace pour prolonger la survie de xéno greffes d'îlots de Langerhans humains chez la souris (Lenschow et al. 1992) et pour prolonger la survie de greffes de cœur chez le rat (Turka et al. 1992). L'emploi du CTLA4-Ig dans cette dernière étude n'a pas permis d'induire un réel état de tolérance, puisque toutes les greffes ont été rejetées. Par contre, lorsqu'une transfusion de cellules du donneur (« donor-specific transfusion » ; DST) a été ajoutée à un court traitement avec le CTLA4-Ig et à des greffes cardiaques chez le rat et la souris, un état de tolérance a été atteint chez la majorité des animaux (Turka et al. 1992; Lin et al. 1993; Sayegh et al. 1997). La DST consiste en l'injection de splénocytes du donneur au moment de la greffe. Les mécanismes par lesquels l'ajout d'une DST augmente l'état de tolérance ne sont pas élucidés, mais il est postulé que la dispersion d'une grande quantité de CPA du donneur dans les organes lymphoïdes permet d'augmenter l'inactivation de la majorité des lymphocytes alloréactifs du donneur. Plusieurs autres études subséquentes utilisant le CTLA4-Ig chez la souris et le rat, incluant la transplantation d'îlots, de cœurs, de reins, de foies, de poumons et de peaux, ont démontré la prolongation de la survie des greffes, et dans certains cas, un état de tolérance a été atteint (Sayegh et al. 1998). Chez le singe, le CTLA4-Ig sous traitement continu a permis de prolonger la survie de greffes d'îlots de Langerhans (Levisetti et al. 1997).

La molécule CTLA-4 induit un signal négatif d'activation du lymphocyte (Wells et al. 2001) et l'interaction par cette molécule a été démontrée nécessaire pour l'induction d'anergie des lymphocytes CD4⁺ *in vivo* (Greenwald et al. 2001). Puisque l'utilisation du CTLA4-Ig bloque les interactions CTLA-4 :B7, aucun signal négatif est généré au lymphocyte. Par contre, l'utilisation d'un anti-CD28 n'a pas permis l'induction de tolérance à des greffes de cœur effectuées chez le rat (Dengler et al. 1999), démontrant que le rejet immunitaire peut s'activer par d'autres signaux que le CD28.

L'anticorps bloquant les signaux de co-stimulation le plus efficace démontré est l'anti-CD154. La molécule CD154 s'exprime sur les lymphocytes T activés (Noelle 1996) et, suite à son interaction avec CD40, induit l'expression de B7 sur la CPA. Il est postulé

que le blocage de CD154 :CD40 prévient la co-stimulation CD28 :B7, inhibant ainsi l'activation des lymphocytes (Ranheim et al. 1993; Rossini et al. 1996; Wells et al. 2001). Concrètement l'utilisation de l'anti-CD154 permet la survie à long terme (habituellement >100 jours) d'allogreffes cardiaques (Larsen et al. 1996a; Lu et al. 1997) et d'allogreffes d'îlots de Langerhans (Rossini et al. 1996). L'utilisation d'un anticorps anti-CD154 humanisé (anti-CD154hu) chez les primates, a permis la survie à long terme de greffes d'îlots de Langerhans (Kenyon et al. 1999). Par contre, l'administration de l'anti-CD154hu s'effectuait mensuellement, et ne représente pas un cas de tolérance, mais d'immunosuppression. Lorsque l'anti-CD154hu est administré en un court traitement au moment de la transplantation chez les primates, seulement une prolongation de la survie de greffes rénales a été observée (Kirk et al. 1999).

Une efficacité accrue a été observée lorsque l'anti-CD154 a été combiné à une DST lors de greffes d'îlots de Langerhans chez la souris (Parker et al. 1995). La combinaison d'une DST et de l'anti-CD154 a aussi permis de prolonger la survie de greffes de peaux, qui est le modèle chez lequel un état de tolérance est le plus difficile à atteindre (Markees et al. 1997). Ce même groupe a démontré que, en utilisant le même protocole, la survie à long terme de greffes de peaux nécessite l'ablation du thymus (Markees et al. 1998). Cette expérience démontre que la présence de nouveaux lymphocytes allo-réactifs ne sont pas inhibés lorsque le traitement tolérisant prend fin.

La combinaison de l'anti-CD154 et du CTLA4-Ig synergise aussi pour améliorer la survie des greffes de coeur à long terme et pour prolonger la survie des greffes de peaux (Hancock et al. 1996; Larsen et al. 1996b). En plus, cette combinaison a été effectuée chez les primates, et une prolongation de la survie de greffes rénales a été démontrée (Kirk et al. 1997).

Le blocage des signaux de co-stimulation avec le CTLA4-Ig et l'anti-CD154 inhibe préférentiellement les lymphocytes CD4⁺ que les lymphocytes CD8⁺ (Newell et al. 1999; Trambley et al. 1999; Iwakoshi et al. 2000; Jones, N. D. et al. 2000; Williams et al. 2000). Cette démonstration soulève un mécanisme important reflétant l'absence de tolérance dans certains cas de transplantations. En effet, certaines combinaisons de souches de souris ont été démontrées résistantes à l'induction de tolérance par l'anti-CD154 et le CTLA4-Ig,

causé par l'absence d'inhibition de l'activation de lymphocytes T CD8⁺ (Williams et al. 2000).

Tableau 4.1 : Résumé des différents protocoles de tolérance périphérique chez les rongeurs utilisant des anticorps monoclonaux non-déplétants.

Catégories	Protocoles*	Types de greffe	Commentaires	Références
Blocage des co-récepteurs	Anti-CD4 + anti-CD8	Cœur Peau	Antigènes mineurs différents	(Chen et al. 1992) (Cobbold et al. 1996)
Blocage de la co-stimulation	CTLA4-Ig	Coeur	Prolongation de la survie	(Turka et al. 1992)
	DST + CTLA4-Ig	Coeur	Tolérance	(Turka et al. 1992; Lin et al. 1993; Sayegh et al. 1997)
	Anti-CD154	Cœur Îlots de Langerhans	Tolérance	(Larsen et al. 1996b; Rossini et al. 1996; Lu et al. 1997)
	DST + anti-CD154	Peau	Prolongation de la survie	(Markees et al. 1997)
		Îlots de Langerhans	Tolérance, plus efficace que anti-CD154 seul	(Parker et al. 1995)
	Anti-CD154 + CTLA4-Ig	Coeur	Tolérance, plus efficace que mAb seuls	(Larsen et al. 1996b)
	Anti-CD45RB	Reins, Îlots de Langerhans	Tolérance	(Lazarovits et al. 1996; Basadonna et al. 1998)
	Anti-CD154 + Anti-CD45RB	Îlots de Langerhans	Tolérance, plus efficace que mAb seuls	(Rothstein et al. 2001)
		Peau	Prolongation de la survie	(Rothstein et al. 2001)
Anti-ICOS + CTLA4-Ig et ICOS-Ig + CTLA4-Ig	Coeur	Tolérance	(Kosuge et al. 2003)	

* ; DST : Transfusion de splénocytes du donneur.

Le blocage de la molécule CD45, par l'utilisation de l'anti-CD45RB a aussi été démontré efficace pour induire la survie à long terme de greffes d'îlots de Langerhans et de greffes rénales chez la souris (Lazarovits et al. 1996; Basadonna et al. 1998). Cet anticorps reconnaît spécifiquement les exons B des molécules de CD45 à la surface des lymphocytes. Le mécanisme d'action exact de cet anticorps n'est pas connu, mais il semble augmenter l'expression de CTLA-4 et réduire l'expression de CD45RB à la surface des lymphocytes (Fecteau et al. 2001). En plus, l'action de l'anti-CD45RB synergise avec l'anti-CD154 pour la survie des greffes d'îlots et de peaux à long terme (Rothstein et al. 2001).

D'autres molécules nécessaires à l'activation des lymphocytes sont présentement sous étude. Mentionnons principalement que le blocage d'ICOS (« inducible costimulator ») en combinaison avec la cyclosporine A permet la survie de greffes cardiaques murines (Ozkaynak et al. 2001). Aussi, l'anti-ICOS ou l'ICOS-Ig synergise avec le CTLA4-Ig pour la survie de greffes cardiaques à long terme (Kosuge et al. 2003).

4.3.3 Protocoles expérimentaux de tolérance centrale

La modulation centrale a permis, à ce jour, les meilleures démonstrations de tolérance. Historiquement ce phénomène date de plusieurs années. En effet les expériences de Medawar et ses collègues, au début des années 1950, ont démontré l'induction de tolérance en injectant des tissus contenant des cellules hématopoïétiques dans des embryons ou des nouveaux-nés souris (Billingham et al. 1953). Le défi consistait ensuite à reproduire cet état chez des hôtes adultes. Le développement de chimérisme, i.e. la co-existence de cellules hématopoïétiques d'un donneur et d'un receveur, rencontre les critères de tolérance les plus élevés. Un de ces critères est l'acceptation permanente de greffes de peaux, ce qui a été très peu atteint par l'utilisation de protocoles de tolérance périphérique. En plus, l'induction de tolérance par chimérisme a été démontrée chez des patients qui ont reçu une greffe de moelle osseuse (BMT : « bone marrow transplantation ») pour des raisons hématologiques, et qui ont reçu par la suite une greffe d'un lobe de poumon (Svendsen et al. 1999) ou une greffe de rein (Sayegh et al. 1991; Helg et al. 1994; Jacobsen et al. 1994; Sorof et al. 1995) provenant du même donneur que la greffe de moelle osseuse. Ces patients ont accepté ces greffes d'organes, même en présence de différents CMH, sans

immunosuppression chronique. Donc, le chimérisme s'induit par la greffe de moelle osseuse contenant des cellules souches hématopoïétiques.

Les problèmes majeurs de ce type de greffe sont la nécessité d'une certaine myéloablation (destruction complète ou d'une partie des cellules de la moelle osseuse) et un contrôle du rejet par les lymphocytes périphériques. Même l'injection de cellules souches hématopoïétiques syngéniques ne permet pas leur implantation (Tomita et al. 1994). Dans la plupart des modèles expérimentaux d'induction de chimérisme, l'élimination de lymphocytes allo-réactifs a été initialement effectuée par destruction complète du répertoire lymphocytaire. Cette destruction a été réalisée par irradiation létale pancorporelle, par l'utilisation d'agents cytotoxiques ou par déplétion complète des lymphocytes T avec des anticorps monoclonaux (Sharabi et al. 1989; Tomita et al. 1989; Pelot et al. 1999). Par contre il a été démontré possible d'obtenir du chimérisme chez la souris en utilisant de très larges doses de cellules de moelle osseuse syngéniques (environ 2×10^8), remplaçant ainsi toute forme de myéloablation (Stewart et al. 1993; Sykes et al. 1998).

L'induction de chimérisme peut s'effectuer à différents niveaux. Si le chimérisme se définit comme la présence de cellules hématopoïétiques étrangères chez un individu, le taux de cette présence peut être différent (Wekerle et al. 2001). On nomme macrochimérisme la présence d'un grand pourcentage de cellules du donneur (>1%). Le macrochimérisme se sous divise aussi en deux catégories : le chimérisme complet (100% cellules du donneur) et les chimérisme mixte (>1% et <100% de cellules du donneur). Le chimérisme complet est induit après une myéloablation totale et une BMT de cellules du donneur (Main et al. 1955), tandis que le chimérisme mixte est induit après une myéloablation partielle (ou spécifique) et une BMT de cellules du donneur (Ildstad et al. 1984; Sharabi et al. 1989). La myéloablation partielle est appelée non-myéloablative dans la littérature, i.e. qu'elle n'induit pas la mort de l'individu sans BMT, contrairement à un traitement myéloablatif. Le macrochimérisme est détecté par la présence de cellules lymphoïdes circulant dans le sang périphérique. Il est facile de déterminer la proportion de ces cellules en utilisant la technique de cytométrie en flux et en marquant les cellules du donneur avec des anticorps monoclonaux fluorescents spécifiques à des antigènes du donneur (comme le CMH de classe I). La présence de cellules du donneur différenciées en périphérie représente

généralement le taux de prise de greffe des cellules souches hématopoïétiques au niveau de la moelle osseuse. Un autre taux de chimérisme, appelé microchimérisme (<1% de cellules du donneur), apparaît spontanément après la transplantation d'organes, contenant normalement des cellules hématopoïétiques (Starzl et al. 1992; Starzl et al. 1993). Le microchimérisme est détecté par des techniques ultrasensibles, comme par PCR. L'implication du microchimérisme dans la survie des greffes n'a pas été démontrée clairement (Schlitt et al. 1994; Wood, K. et al. 1996; Elwood et al. 1997; Sivasai et al. 1997).

Le chimérisme mixte offre certains avantages par rapport au chimérisme complet, incluant une immunocompétence supérieure (Singer et al. 1981; Ildstad et al. 1986) et une susceptibilité réduite de GVHD (Ildstad et al. 1986). Récemment, il a été démontré possible d'inactiver et d'éliminer les lymphocytes T allo-réactifs seulement, tout en laissant le répertoire des lymphocytes T essentiellement intact. En plus du mécanisme de sélection thymique, ces protocoles impliquent la délétion clonale périphérique et l'anergie après une BMT et en bloquant les signaux de co-stimulation (Wekerle et al. 1998). Depuis la première BMT réussie chez l'humain vers la fin des années 60 (Bach et al. 1968), de considérables progrès ont été accomplis dans le prétraitement des patients. Cependant, l'application des greffes de moelle osseuse est encore largement restreinte aux patients atteints de maladies malignes ou d'immunodéficiences sévères. Il est donc impératif de développer des protocoles de BMT les moins toxiques possibles pour permettre l'application de cette approche à la tolérance de greffes d'organes ou de cellules.

En ce sens, plusieurs protocoles non-myéloablatif ont été développés pour induire du macrochimérisme et de la tolérance chez les rongeurs, en évitant les problèmes de GVHD. La plupart des protocoles incluant une BMT et des anticorps déplétants ou bloquant les signaux de co-stimulation, ne nécessitent pas la déplétion des lymphocytes T des cellules de moelle du donneur, dû à l'inhibition des GVHD par ceux-ci. Par contre, les protocoles n'utilisant pas de ces anticorps nécessitent la déplétion des lymphocytes T des extraits de moelle du donneur avant leur injection. Nous allons premièrement répertorier les protocoles non-myéloablatifs en deux catégories : ceux utilisant des drogues cytoréductrices et ceux

utilisant des anticorps monoclonaux. Le tableau 4.2 résume les différents protocoles non-myéloablatif de tolérance centrale par chimérisme mixte chez les rongeurs.

4.3.3.1 Chimérisme avec des drogues cytoréductrices

Les agents alkylants et certains agents anti-néoplasiques ont la capacité de détruire les cellules de la moelle osseuse, permettant leur utilisation lors de greffes de moelle osseuse. Par contre, l'utilisation des ces agents est accompagnée d'une certaine toxicité, dépendamment de la dose utilisée. Parmi ces agents, il y a le cyclophosphamide (Mayumi et al. 1989), le busulfan (Tomita et al. 2000), le diméthyl myleran (de Vries-van der Zwan et al. 1998), le fludarabine (Pan et al. 2003) et le treosulfan (van Pel et al. 2003). Plusieurs protocoles ont été développés chez les rongeurs, mais la plupart combinent les agents cytoréducteurs avec l'utilisation d'anticorps monoclonaux déplétants ou, plus récemment, bloquant les signaux de co-stimulation (Mayumi et al. 1989; de Vries-van der Zwan et al. 1998; Pan et al. 2003; van Pel et al. 2003). L'approche de Tomita et al. (2000) utilise une injection de splénocytes du donneur (DST) au même moment qu'une injection de cyclophosphamide, suivi d'une BMT et un traitement avec le busulfan. La combinaison DST + cyclophosphamide permet d'inhiber la prolifération des clones allo-réactifs, tandis que le busulfan permet l'implantation des cellules de moelle. Ce protocole permet l'induction de chimérisme et de tolérance à des greffes de peau (Tomita et al. 2000).

4.3.3.2 Chimérisme avec des anticorps monoclonaux

4.3.3.2.1 Anticorps déplétants

Le groupe de Sachs est un des pionniers dans le développement de protocoles non-myéloablatifs pour l'induction de tolérance. Leur protocole initial consistait en l'élimination du répertoire des lymphocytes T par l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-CD4 et anti-CD8 déplétants. Les hôtes recevaient ensuite une faible dose d'irradiation pancorporelle (TBI; « total body irradiation ») de 3 Gy, une irradiation thymique de 7 Gy et une dose standard de cellules de moelle osseuse complètement allogénique (environ 15×10^6) (Sharabi et al. 1989). Une TBI à cette dose détruit seulement une partie de la moelle de la souris traitée, permettant sa survie et le rétablissement de ses fonctions normales, sans nécessiter une BMT. Les souris recevant ce traitement ont démontré un chimérisme mixte à

long terme dans plusieurs lignées lymphoïdes et une tolérance envers une greffe de peau provenant du même donneur. L'irradiation thymique de 7 Gy peut être remplacée dans ce protocole en ajoutant des doses d'anticorps déplétants, réduisant ainsi la toxicité (Tomita et al. 1996a; Tomita et al. 1996b).

Un autre protocole similaire utilisant un anti-CD3, un anti-CD4, une faible dose d'irradiation pancorporelle (3 à 6 Gy) et une BMT une heure avant une greffe de peau du même donneur a permis la survie à long terme de ces greffes de peau. Ce protocole de greffe de moelle permet de démontrer qu'une greffe de moelle peut être réalisée au même moment que la greffe d'organe, ouvrant la voie à l'utilisation de donneurs cadavériques (de Vries-van der Zwan et al. 1997).

La combinaison de drogues cytoréductrices et d'anticorps monoclonaux déplétants a été largement utilisée et développée chez les rongeurs. Cette combinaison permet, dans la plupart des cas, de diminuer les doses des drogues cytoréductrices utilisées, réduisant ainsi la toxicité. Les protocoles suivants ont permis l'induction de macrochimérisme et de tolérance envers les greffes de peau chez la majorité de hôtes. Notons initialement l'utilisation d'anti-Thy 1.2 (CD90) combinée à une DST, une BMT et une injection de cyclophosphamide intrapéritonéale (Mayumi et al. 1989). Dans un protocole similaire, l'anti-Thy 1.2 a été remplacé par un anti-CD4 (Omoto et al. 1996). La combinaison de drogues cytoréductrices (diméthyl myleran + cyclophosphamide) et d'anticorps déplétants (anti-CD3 et anti-CD4) a aussi permis l'induction de tolérance (de Vries-van der Zwan et al. 1998). L'utilisation de drogues moins toxiques (treosulfan) a récemment aussi permis de démontrer une bonne efficacité de chimérisme et de tolérance, combinée à des anticorps déplétants les lymphocytes T (van Pel et al. 2003).

4.3.3.2.2 *Blocage des signaux de co-stimulation*

L'utilisation d'anticorps déplétants les lymphocytes T en périphérie est suivie d'une longue période d'immunoincompétence sévère et nécessite de bonnes fonctions thymiques pour régénérer le répertoire lymphocytaire (Wekerle et al. 2001). Malgré la démonstration récente que les fonctions thymiques chez l'humain adulte sont plus préservées que communément cru (Haynes et al. 2000), une période de vulnérabilité prolongée se produirait

inévitablement. L'utilisation d'anticorps bloquant les signaux de co-stimulation des lymphocytes T, inclut dans un protocole de BMT, permettrait d'éviter la déplétion massive lymphocytaire, et ainsi conserver une meilleure immunocompétence (Wekerle et al. 1998).

Tableau 4.2 : Résumé des différents protocoles non-myéloablatif de tolérance centrale par chimérisme mixte chez les rongeurs. Tous ces protocoles ont induit un macrochimérisme chez la majorité des receveurs et ont induit une tolérance à des greffes de peau.

Catégories	Protocoles*	Références
Drogues cytoréductrices	DST + CyP + BMT + Busulfan	(Tomita et al. 2000)
Anticorps déplétants	Anti-CD4 + anti-CD8 + TBI 3 Gy + IT 7 Gy + BMT	(Sharabi et al. 1989)
	Anti-CD4 + anti-CD8 + TBI 3 Gy + + BMT	(Tomita et al. 1996a; Tomita et al. 1996b)
	Anti-CD3 + anti-CD4 + TBI 3-6 Gy + BMT	(de Vries-van der Zwan et al. 1997)
	Anti-CD4 + DST + CyP + BMT	(Omoto et al. 1996)
	Anti-Thy-1.2 + DST + CyP + BMT	(Mayumi et al. 1989)
	Anti-CD3 + anti-CD4 + DMM + CyP + BMT	(de Vries-van der Zwan et al. 1998)
	Anti-CD3 + Treosulfan + BMT	(van Pel et al. 2003)
Blocage de la co-stimulation : Myéloablation partielle	Anti-CD154 + CTLA4-Ig + TBI 3Gy + BMT	(Wekerle et al. 1998)
	Anti-CD154 + anti-CD8 + TBI 3Gy + BMT	(Ito et al. 2001)
	Anti-CD154 + CTLA4-Ig + Busulfan + BMT	(Adams et al. 2001)
	Anti-CD154 + Fludarabine + CyP + BMT	(Pan et al. 2003)
Blocage de la co-stimulation : Sans myéloablation	Anti-CD154 + CTLA4-Ig + Méga dose BMT	(Wekerle et al. 2000)
	Anti-CD154 + Méga dose BMT	(Durham et al. 2000)
	Anti-CD154 + DST + Dose moyenne BMT	(Seung et al. 2003)

* ; DST : Transfusion de splénocytes du donneur, CyP : Cyclophosphamide, BMT : Greffe de moelle osseuse, TBI : Irradiation pancorporelle, IT : Irradiation thymique, DMM : Diméthyl Myleran.

Myéloablation partielle

En utilisant une dose d'anti-CD154 et de CTLA-Ig, une dose standard de cellules de moelle osseuse ($15-20 \times 10^6$) et une faible dose d'irradiation pancorporelle de 3 Gy, il a été possible d'obtenir du macrochimérisme à long terme sans élimination non-spécifique des lymphocytes de l'hôte (Wekerle et al. 1998). Les souris chimériques obtenues par ce protocole ont démontré une tolérance envers des greffes de peaux du donneur, tout en rejetant des greffes du même type provenant de souris non apparentées. La Figure 4.2 schématise les mécanismes impliqués lors de l'emploi de ce protocole. En premier lieu, les anticorps bloquants vont éliminer les lymphocytes allo-réactifs en périphérie, permettant ainsi la survie des cellules souches de s'implanter au niveau de la moelle osseuse. Par la suite, certaines CPA originant de la BMT vont migrer au thymus et participer à la sélection des lymphocytes néoformés. Le résultat final consiste en la présence en périphérie de deux populations lymphocytaires tolérantes aux antigènes du donneur et du receveur.

Un protocole similaire et plus fiable (100% des souris traitées développent du chimérisme), constitué d'une dose de chaque anticorps anti-CD154 et anti-CD8 (déplétant), une dose standard de cellules de moelle osseuse ($15-20 \times 10^6$) et une faible dose d'irradiation pancorporelle de 3 Gy, permet des résultats aussi concluants (Ito et al. 2001). L'utilisation de l'anti-CD154 seul dans ce protocole induit du chimérisme que chez 50% des souris traitées (Wekerle et al. 1998; Ito et al. 2001).

L'emploi d'anticorps bloquants les signaux de co-stimulation se marie aussi très bien avec les drogues cytoréductrices. En effet, la combinaison de l'anti-CD154, du CTLA4-Ig et du busulfan, a permis la prise de greffe de moelle osseuse et l'induction de tolérance envers des greffes de peaux (Adams et al. 2001). Le busulfan remplace l'irradiation pancorporelle, réduisant ainsi les effets secondaires non-spécifiques. Dans cette même voie, il a été récemment démontré que l'utilisation d'une combinaison fludarabine, cyclophosphamide et de l'anti-CD154 a permis l'induction de chimérisme et de tolérance envers des greffes de peaux (Pan et al. 2003).

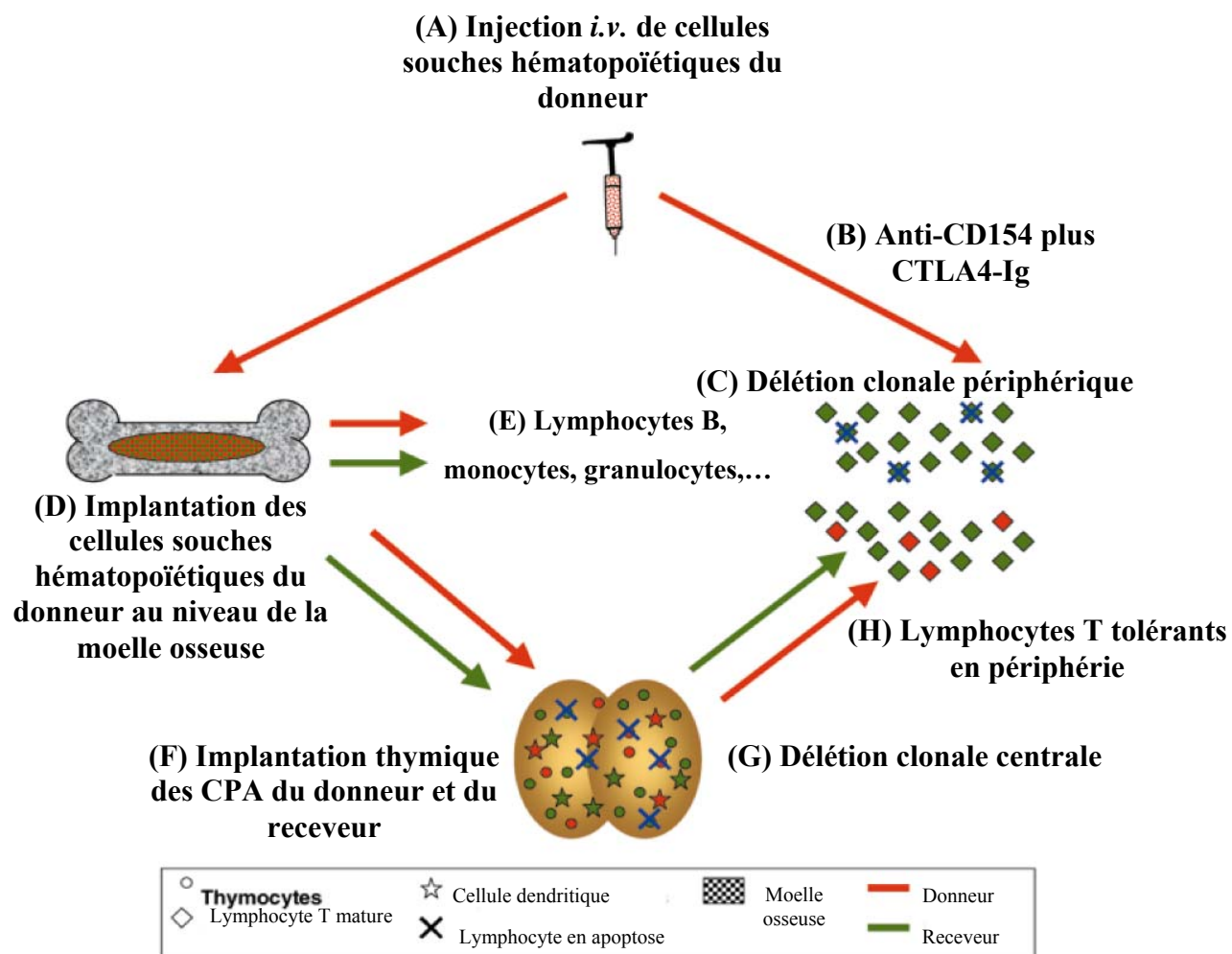


Figure 4.2 : Schéma des mécanismes impliqués lors de l'induction de tolérance centrale par chimérisme mixte en utilisant un protocole non-myéloablatif de greffe de moelle osseuse combiné au blocage des signaux de co-stimulation des lymphocytes T.

(Wekerle et al. 2001)

Sans myéloablation

Le but principal de ces protocoles d'induction de tolérance est de se rapprocher le plus possible d'une application clinique, nécessitant une réduction maximale de la toxicité. En suivant cette logique, certains protocoles efficaces de BMT ont été développés n'utilisant aucune forme de cytoréduction (Durham et al. 2000; Wekerle et al. 2000; Seung et al. 2003). Ces protocoles doivent utiliser des méga doses de cellules de moelle osseuse (environ 2×10^8) pour permettre le développement de macrochimérisme, combiné à soit une dose de chaque anticorps anti-CD154 et CTLA4-Ig (Wekerle et al. 2000), soit à plusieurs doses d'anti-CD154 (Durham et al. 2000). Récemment, un protocole d'induction de chimérisme et de tolérance a été démontré en combinant une DST, une BMT de quantité moyenne (entre 50×10^6 et 100×10^6 cellules de moelle osseuse) et plusieurs doses d'anti-CD154 (Seung et al. 2003). L'utilisation de ces protocoles en clinique serait limitée par une mobilisation intensive de cellules du donneur.

4.3.3.2.3 Chimérisme mixte chez le porc et le primate

L'établissement de chimérisme chez les primates et le porc a été considérablement plus difficile que chez les rongeurs. Cette difficulté peut être attribuable au manque de réactifs aussi efficaces chez les rongeurs que chez les primates et les porcs (Wekerle et al. 2001).

C'est en l'an 2000 que la première démonstration d'un protocole non-myéloablatif efficace chez le porc utilisant un donneur complètement allogénique et induisant du chimérisme à long terme et de la tolérance envers des greffes de peaux a été publiée (Fuchimoto et al. 2000). Ce protocole incluait une dose élevée de cellules progénitrices périphériques, une immunotoxine anti-CD3, une irradiation thymique de 7 Gy, sans aucune irradiation pancorporelle (TBI). Ces résultats démontrent la faisabilité d'utilisation de méga doses de cellules de moelle pour remplacer la TBI autre que chez les rongeurs.

Le macrochimérisme a aussi été induit chez les primates et a démontré une induction de tolérance à des transplantation de reins (Kawai et al. 1995; Kimikawa et al. 1997). Le protocole incluait des injections de « antithymocyte globulin » (anticorps déplaçant les lymphocytes T), deux doses de 1,5 Gy de TBI, une splénectomie avant la BMT et la

transplantation d'un rein du même donneur. Les singes ont aussi reçu une immunosuppression à la Cyclosporine A pendant 4 semaines suivant la BMT. Le chimérisme a été détectable dans le sang périphérique jusqu'à 68 jours suivant la BMT, permettant la survie des greffes de reins à très long terme (Kawai et al. 1995). Récemment, il a été démontré par le même groupe, qu'en utilisant le même protocole à des greffes cardiaques, la tolérance n'a pas été induite (Kimikawa et al. 1997; Kawai et al. 2002). En conclusion, le développement de chimérisme chez le singe, en utilisant un protocole non-myéloablatif, n'a pas encore été démontré.

Chapitre 5. Le traitement avec l'anticorps anti-CD154 et une transfusion de splénocytes du donneur prévient le rejet aigu de myoblastes transplantés

Ce chapitre présente le premier de trois articles scientifiques de cette thèse et détaille les résultats de transplantation de myoblastes obtenus en tentant de développer une tolérance immunologique périphérique. À noter, l'auteur principal a effectué la majorité des expériences et de l'écriture de cet article. Cet article a été publié dans la revue *Transplantation* 2002 Feb 15; 73(3):453-61.

5.1 Résumé

L'obtention d'une tolérance immunologique périphérique pour la transplantation de myoblastes réduirait les effets indésirables liés à une immunosuppression soutenue nécessaire pour cette approche thérapeutique expérimentale comme traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne. Le protocole utilisé consistait à une injection de splénocytes du donneur sept jours avant la transplantation (-7) et des injections *i.p.* de 500 µg d'anticorps anti-CD154 aux jours -7, -4, 0, +4. Nous avons obtenu une survie des myoblastes transplantés chez 83, 60 et 20% des souris *mdx* traitées à 1, 3, et 6 mois respectivement, après la transplantation. Ce protocole a aussi réussi à inhiber la production d'anticorps contre les cellules du donneur jusqu'à 3 mois après la transplantation. Cependant, une importante infiltration de lymphocytes cytotoxiques a été observée dans les muscles de souris *mdx* contenant un pourcentage élevé de fibres exprimant la dystrophine. En conclusion, en utilisant un protocole de tolérance immunologique démontré efficace à d'autres types de transplantation, nous avons réussi à prolonger la survie de myoblastes allogéniques sans pourtant obtenir de tolérance, suggérant une immunogénicité accrue des myoblastes.

5.2 Titre: Treatment with anti-CD154 antibody and donor-specific transfusion prevents acute rejection of myoblast transplantation¹

**Geoffrey Camirand², Nicolas J. Caron², Nicole A. Turgeon³, Aldo A. Rossini³ and
Jacques P. Tremblay^{2,4}**

Unité de recherche en génétique humaine, Centre de recherche du CHUL, Université Laval,
Québec, Canada, G1V 4G2.

Department of medicine, diabetes division, University of Massachusetts Medical School,
Worcester, MA 01605, USA.

Mailing address :

Jacques P. Tremblay, Ph.D., Professeur département d'Anatomie-Physiologie, Université
Laval, Unité de Génétique humaine, Centre Hospitalier de l'Université Laval, 2705 boul.
Laurier, RC-9300, Ste-Foy (Qc) Canada G1V 4G2,

fax: 418-654-2207

tel: 418-654-2186

tel: 418-656-4141 ext. 7307

Jacques-P.Tremblay@crchul.ulaval.ca

5.2.1 Footnotes:

¹ This work was supported by grants from the Muscular Dystrophy Association (MDA) of USA and the Association Française contre les Myopathies (AFM).

² Unité de recherche en génétique humaine, Centre de recherche du CHUL, Université Laval, Québec, Canada, G1V 4G2.

³ Department of medicine, diabetes division, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01605, USA.

⁴ Address correspondence to: Jacques P. Tremblay, Ph.D., Université Laval, Unité de Génétique humaine, Centre Hospitalier de l'Université Laval, 2705 boul. Laurier, RC-9300, Ste-Foy (Qc) Canada, G1V 4G2, Jacques-P.Tremblay@crchul.ulaval.ca

⁵ Kurtz J, Ito H, Wekerly T, Shaffer J, Sykes M. Mechanisms involved in the establishment of tolerance through costimulatory blockade and BMT: lack of requirement for CD40L-mediated signaling for tolerance or deletion of donor-reactive CD4⁺ cells. Submitted to J. of Immunol, 2001.

5.2.2 Abbreviations:

APC: Antigen presenting cell

DST: Donor-specific Transfusion

DMD: Duchenne muscular dystrophy

IL: Interleukin

INF: Interferon

mAb: Monoclonal antibody

MHC: Major histocompatibility complex

TA: *Tibialis anterior*

5.2.3 KEY WORDS

Myoblast transplantation, DMD, anti-CD154, graft survival.

5.3 Abstract

Background. Achieving immunological tolerance to transplanted myoblasts would reduce the adverse effects associated with the sustained immunosuppression required for this experimental therapeutic approach in Duchenne muscular dystrophic patients.

Methods. *Mdx* mice were transplanted with fully allogeneic BALB/c myoblasts in the *Tibialis anterior* muscles. Seven days before transplantation (-7), host mice received 10^7 total donor spleen cells *i.v.* (donor-specific transfusion, DST) with 500 μ g of anti-CD154 mAb *i.p.* on days -7, -4, 0, +4.

Results. Results showed a high level of dystrophin expression in 83%, 60% and 20% of the mice one month, three months and six months respectively after transplantation of myoblasts. No antibodies against the donor cells were produced up to three months following transplantation. However, abundant activated cytotoxic cells were present in muscles still expressing high percentage of dystrophin positive fibers.

Conclusions. In conclusion, the DST + anti-CD154 mAb treatments effectively prolonged myoblast survival, but this treatment could not develop tolerance to complete allogeneic myoblast transplantation..

5.4 Introduction

Myoblast transplantation is a potential therapy to restore dystrophin expression and increase the strength of some muscles in Duchenne muscular dystrophic (DMD) patients (1-3). The normal transplanted myoblasts fuse with the host muscle fibers and thus introduce their nuclei that contain the normal dystrophin gene. One of the problems facing this therapy is the immune reaction directed against the transplanted cells (4, 5). Sustained immunosuppression is currently unavoidable and is unfortunately associated with severe side effects (6, 7).

Development of an immunological tolerance toward transplanted cells may permit long term graft survival without a sustained immunosuppressive treatment. Many protocols to develop immunological tolerance have been investigated, but most of them were only effective in rodent models, needed sustained antibody treatment or irradiation of the host (8). One promising tolerance protocol is the use of anti-CD154 antibody combined with donor-specific transfusion (DST). This combination was proven effective in rodent, where permanent murine islet allograft survival (9, 10), prolongation of murine skin allograft and xenograft survival were established (11, 12). In monkeys, long term islet allograft survival and prolongation of renal allograft survival was observed using a humanized anti-CD154 antibody alone (13).

CD154 (CD40 ligand), a member of the TNF family (14), is expressed primarily on activated CD4⁺ cells and platelets, but has also been reported on CD8⁺ cells, mast cells and basophils (15-18). The interaction CD154-CD40 is essential for T cell activation. This signal is termed co-activation and is part of a three steps activation signal (8). The first step consists in the engagement of the T cell receptor by the major histocompatibility complex (MHC) on an antigen presenting cell (APC) and permits antigen recognition. This engagement induces CD154 expression on the activated T cell and thus interaction with CD40 on the APC (co-activation). The co-activation signal leads to up-regulation of the costimulatory molecules B7-1 and B7-2. The third step (costimulation) is initialized when these costimulatory molecules interact with CD28 on an APC. By using antibodies to block

these signals, CD4⁺ T cells become inactivated following alloantigen recognition and a state of tolerance can be induced (19-22).

Little is known about the mechanisms by which the combination of anti-CD154 antibody with a single DST seven days pre-transplantation lead to development of immunological tolerance. Hypothetically, DST would serve as "signal 1" for T lymphocyte activation while the anti-CD154 antibody would impede the costimulation signal (signal 2) (10, 23). In that manner, the alloreactive T lymphocytes would fail to be activated and permit graft survival. More recently, Iwakoshi et al. showed that DST + anti-CD154 antibody treatment deleted alloreactive CD8⁺ T cells (24).

To determine whether the tolerance protocol using DST + anti-CD154 antibody is effective with myoblast transplantation, we verified one, three and six months post-transplantation the presence of dystrophin in *mdx* mouse muscles (DMD mouse model). We observed that the percentage of mice expressing dystrophin in their muscle fibers decreased slowly with time. Muscles of the mice still expressing dystrophin positive fibers showed some signs of rejection revealed by histology, immunohistochemistry and RT-PCR. However, there was no production of antibodies against the donor cells detected up to three months post-transplantation. The treatment with anti-CD154 mAb alone or DST alone could not prevent rejection within one month.

5.5 Materials and Methods

Mouse myoblast culture.

Newborn transgenic BALB/c mice (Jackson Laboratory, H-2^d) or transgenic TnI-LacZ1/29 mice (CD1 background; gift from K. Hasting, McGill University, Canada) were used for primary myoblast cultures as previously described (25). Briefly, mice were killed by cervical dislocation, the arms and legs were skinned and muscles were cut into small fragments that were dissociated at 37°C, initially with collagenase (600 IU/ml; Sigma, St-Louis, MO) for 1 hr and with trypsin (0,1% w/v; Gibco, Grand Island, NY) for 30 min in Hank's balanced salt solution (HBSS) (Gibco). The cell suspension was grown in DMEM (Gibco) supplemented with 15% fetal calf serum (FCS) and a mixture of penicillin G (10

000 IU/ml) and streptomycin (10 mg/ml). After two days in culture, cells were harvested and frozen in DMEM, 50% FCS and 10% dimethyl sulfoxide, until transplantation.

Myoblast transplantation.

Left hind legs of the *mdx* (dystrophic mouse model, C57BL10J *mdx/mdx*, Jackson laboratory, H-2^b) or CD154 KO (Jackson laboratory) recipient mice (2-4 months of age) were irradiated (20 Gy) to inhibit host myoblast proliferation and thus reduce competition with grafted myoblasts (26). The day of transplantation, cells were thawed in DMEM containing 15 % FCS, and washed twice in HBSS. Cell viability was assessed using trypan blue staining. The lefts Tibialis anterior (TA) were surgically exposed and cells were injected in several sites to distribute the cells throughout the entire muscle. Prior to injection, 1×10^6 cells were resuspended in 10 μ l of notexin venom (5 μ g/ml) to induce fiber necrosis without affecting the blood vessels and nerve ending (27). The TA muscles of *mdx* mice (H-2^b) were injected with fully allogeneic MHC BALB/c myoblasts (H-2^d) and the TA muscles of CD154 KO mice were injected with fully allogeneic MHC TnI-LacZ1/29 myoblasts (outbred background). All animals were housed in microisolator cages with sterile water and food, and maintained in accordance with the laboratory animal care and use committee protocols of Laval University.

DST and antibody treatment.

DST consisted of a single i.v. dose of 10^6 male and female adult BALB/c splenocytes seven days before transplantation in *mdx* recipient. Briefly, spleen were harvested aseptically and crushed in a cell strainer. Red cells were lysed using an ammonium chloride solution and spleen cells were washed twice with RPMI medium 1640 (Gibco). Cell suspension was filtered through a 70 μ m nylon mesh (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) before assessing cell viability using trypan blue. Volume was adjusted to 40 millions of living cells /ml in RPMI medium 1640 and a volume of 0.25 ml was injected in the tail vein of the mice. The MR1 hamster anti-mouse CD154 mAb was produced as ascites in SCID mice (28, 29). Ab concentration was determined by ELISA. Anti-CD154 mAb was administered i.p. at a dose of 0.5 mg per mouse four times (days -7, -4, 0, +4, relatively to the time of transplantation) for the one month experiment and 6 times

(days -7, -4, 0, +4, +7,+14) for the three and six months experiments. FK506 (Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd, Osaka, Japan) was administered intra muscularly at 2.5 mg/kg/d from day 0.

Blood and muscle collection.

Mice were deeply anesthetized with ketamine (10 mg/ml) and xylazine (10 mg/ml), blood was collected by cardiac puncture, and mice were perfused with saline containing heparin (2 UI/ml; Leo Laboratories, Ajax, Canada). The left TA injected with myoblasts were placed in a 30% sucrose solution for 24 hrs and then embedded in OCT (Miles Inc., Elkhart, IN), frozen in liquid nitrogen and serially sectioned at 12 μ m using a Microm cryostat. The right TA muscles, from the same mice, also transplanted with myoblasts, were snap frozen in nitrogen liquid for RNA extraction.

Immunohistochemical detection of dystrophin and revelation of β -galactosidase expression

Nonspecific binding sites were blocked by incubating the cryostat sections with 10% FBS in PBS for 1 hr. The sections were then incubated with a rabbit anti-dystrophin antibody (kind gift from Dr J. Chamberlain, Ohio) (1:5000, 1 hr), followed by a goat anti-rabbit IgG conjugated with Alexa 488 (1:200, 1 hr, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Dystrophin staining was observed under a UV lamp microscope using an FITC filter. For β -galactosidase expression, muscle sections were fixed using 0.25% glutaraldehyde for 5 min and stained in 0.4 mM X-Gal in a dark box at room temperature.

CD4, CD8 and cytokines immunohistochemistry

Nonspecific binding sites on cryostat sections were blocked with fetal bovine serum (10% in PBS, 25 min). The sections were then incubated with a rat anti-CD4 antibody (clone GK 1.5; ATCC, Rockville, MD) for 1 hr, or a rat anti-CD8 antibody (clone YTS 169; gift from Dr. Waldmann, Oxford University, Oxford, UK), or a rabbit anti-IL-10 antibody (Antigenix America, Huntington, NY), or a rabbit anti-INF- γ antibody (PBL Biomedical Laboratories, New Brunswick, NJ). For CD4 and CD8 staining, endogenous peroxidase activity was extinguished with 0.03% hydrogen peroxide in methanol for 15 min. The

sections were then incubated for 30 min with a biotin-conjugated rabbit anti-rat antibody (1:150, Dako), followed by 30 min incubation with streptavidin-peroxidase (1:200, Dako) or with Cy3-conjugated streptavidin (1:750, Sigma). Peroxidase activity was revealed with 3,3'-diaminobenzidine (1 mg/ml) and hydrogen peroxide (0.03%). After anti-IL-10 or anti-INF- γ incubations, microscope slides were incubated with ALEXA 488-conjugated anti-rabbit antibody (1:300, Molecular probes, Eugene, Oregon, USA).

Antibody detection

Donor myoblast cells were plated in a 96 wells plate until confluence. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 minutes and washed with PBS containing 100 mM glycine. 10% FBS was used for blocking before the mouse serum was added (1:500 in PBS). Anti-mouse antibody coupled with peroxidase (1:10 000, Jackson Laboratory, Bar Harbor, Ma, USA) and OPD were used to reveal the recipient antibodies fixed on donor cells. Plates were read at 450 nm (Wallac 1420 VICTOR2, Wallac Canada).

RT-PCR analysis

RNA from frozen muscles was extracted for cytokine and granzyme B mRNA expression using Trizol reagent (Gibco BRL) according to the manufacturer procedure. RT reactions were performed using random hexamer primers (Pharmacia) at 42 °C for 1 hour. 18S and IL-2 primers were purchased from Ambion (Texas, USA). Granzyme B primers sense: CCCAGGCGCAATGCTAAT and primer antisense: CCAGGATAAGAACTCGA (30), IL-4 primer sense: AACGAAGAACACCACAGAGAG and primer antisense: ACTTGAGGTCCTGTGAGGAG (385 bp product), IL-10 primer sense: CTGCCTGCTCTTACTGACTGGC and primer antisense: AATCACTCTTCACCTGCTCC (415 bp product), INF- γ primer sense: CACGGCACAGTCATTGAAAGCC and primer antisense: CTTATTGGGACAATCTCTTCCC (435 bp product). 35 cycles were performed by PCR and annealing temperatures were 65 °C for IL-4, IL-10 and INF- γ ; 58 °C for 18S and IL-2; and 55 °C for granzyme B. PCR products were separated with 1.5% agarose gels and stained with ethidium bromide. Bands were quantified using Alfa Imager software (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA).

Microchimerism determination

Blood and spleen from mice treated with DST + anti-CD154 and sacrificed at three months were kept for microchimerism analysis. Briefly, blood cells and spleen cells were separated using a Ficoll gradient for lymphocyte isolation (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) and stained with an anti-MHC class I H-2^d haplotype (Biodesign, Main, USA) specific for the donor strain. Results were analyzed by flow cytometer (Epics XL, Coulter, Miami, FL, USA).

Detection of male Y chromosomes by competitive PCR was also used for microchimerism detection. Briefly, DNA from the spleen, bone marrow, thymus and liver of mice was analyzed by competitive PCR to detect the presence of Y chromosomes in these female tissues as described (31). This procedure is based on the quantification of relative amounts of products from the target Y chromosome sequence and a competitive template introduced in each specimen. Purified DNA samples are co-amplified with a competitive sequence. Two amplicons are obtained using this technique; a 571 bp band corresponding to the amplification of competitive plasmid DNA and a 488 bp generated by the amplification of a region of the mouse Y chromosome. Ethidium bromide stained DNA was scanned with an AlphaImager digital imaging system (Alpha Innotech, San Leandro, CA), carefully avoiding saturation.

Statistical analysis

Fisher PLSD test was used for statistical analysis using the Stat View software (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) and p values < 0.05 or < 0.01, as indicated, were considered statistically significant.

5.6 Results

Presence of high level of dystrophin protein in muscles up to three months after transplantation of normal myoblasts.

One way to determine the success of myoblast transplantation is to look for dystrophin expression in muscles of *mdx* mice. The number of dystrophin positive fibers in a muscle injected with normal myoblasts is correlated with the survival or the escape of these cells from the immune system. Successful grafting (i.e. more than 300 dystrophin positive fibers, about 20% of the whole TA) was observed in 5 out of 6 mice (83%) one month after transplantation, in 3 out of 5 mice (60%) three months after transplantation and in 1 out of 5 mice (20%) six months after transplantation in the groups treated with a short course of DST + anti-CD154 antibody (Table 5.1 and Figure 5.1A). Each time point represents a different experiment. Moreover, very few dystrophin positive fibers (less than 2% of the whole TA) were observed in groups treated with DST alone, with anti-CD154 mAb alone or which received no treatment.

Massive infiltration of CD4+ and CD8+ cells in the DST + anti-CD154 mAb groups.

5 to 13 times more infiltrating lymphocytes were observed one month and three months after transplantation in the DST + anti-CD154 mAb groups than in the FK506 immunosuppressed groups (Table 5.1 and Figure 5.1). A diminution in the number of infiltrating CD4+ cells was observed between 1 month and 3 months experiments in the groups which received DST + anti-CD154 (Table 5.1). However, 3 months after transplantation, clusters of abundant CD8+ lymphocytes were observed surrounding muscle fibers localized in the dystrophin positive regions of the host muscles, while this was not observed in the muscles of the FK506 treated mice (Figure 5.1). At 6 months post-transplantation, the major infiltration of lymphocytes was correlated with the expression of dystrophin in the muscle fibers (Table 5.1C). The muscle of the mouse that still expressed a high level of dystrophin was largely infiltrated with lymphocytes. Clusters of CD8+ lymphocytes surrounding muscle fibers were also observed in this muscle, suggesting a rejection process (not shown).

Table 5.1. Time course of graft results and immune responses following myoblast transplantation after DST + anti-CD154 mAb treatments

A. One month post-transplantation[†]

Treatments	Number of dystrophin fibers		CD4 ⁺ cells	CD8 ⁺ cells	Production of Ab
	Mean (SD)		Mean (SD)	Mean (SD)	
DST + anti-CD154 (n=3)	790, 1490, 1216 *	1165 (353)	1150 (177) •	1199 (235) •	Negative
Anti-CD154 (n=5)	56, 29, 41, 42, 15	37 (15) •	290 (85)	262 (72)	Negative
DST (n=5)	17, 19, 26, 14, 31	21 (7) •	228 (45)	201 (77)	Positive
No treatment ^Δ (n=5)	8, 26, 5, 18, 17	14 (8) •	229 (45)	121 (23)	Positive
FK506 (n=4)	1252, 1806, 1312, 1521	1463 (250)	231 (45)	150 (11)	Negative

* In a second experiment, 2 out of 3 mice accepted the graft (not shown), for a total of 83% of acceptance at one month.

Δ Mice were transplanted with myoblasts without other treatment.

B. Three months post-transplantation[†]

Treatments	Number of dystrophin fibers		CD4 ⁺ cells	CD8 ⁺ cells	Production of Ab
	Mean (SD)		Mean (SD)	Mean (SD)	
DST + anti-CD154 (n=5)	1367, 937, 386, 12, 10	897 (492)	350 (269) [◇]	1449 (642) •	Negative
FK506 (n=5)	810, 651, 1376, 725, 450	802 (350)	26 (27)	186 (132)	Negative

C. Six months post-transplantation[†]

Treatments		Number of dystrophin fibers	CD4 ⁺ cells	CD8 ⁺ cells	Production of Ab
DST + anti-CD154	Mouse 1	34	157	79	Positive
	Mouse 2	19	135	11	Positive
	Mouse 3	27	32	7	Negative
	Mouse 4	37	243	329	Positive
	Mouse 5	744	839	951	Positive

[†] Each time point represents a different experiment.

• p < 0.01 compared to the FK506 treated group.

◇ p < 0.05 compared to the FK506 treated group.

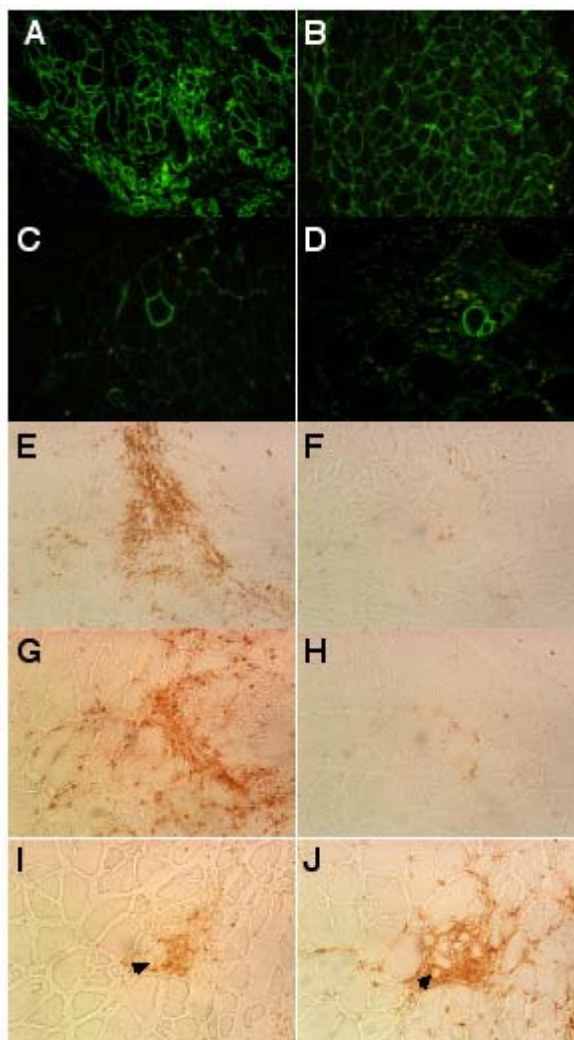


Figure 5.1: Immunohistochemical detection of dystrophin (A-D) and infiltrating immune cells (E-J) in muscles injected with myoblasts. Dystrophin expression was observed in a high percentage of muscle fibers in the mice which received the DST + anti-CD154 (A) or a sustained immunosuppression with FK506 (B), while in the other groups, treated with anti-CD154 alone (C), with DST alone (D) or untreated mice (not shown), few dystrophin positive fibers (less than 1%) were observed. An important infiltration of CD4⁺ and CD8⁺ cells (E and G respectively) was observed in the group treated with DST + anti-CD154 compared to the FK506 treated mice (CD4⁺ in F and CD8⁺ in H). Three months post-transplantation, the infiltration of CD4⁺ cells in the muscles of DST + anti-CD154 treated mice (I) was lower than that observed one month post-transplantation, but the presence of CD8⁺ cells was still important and these cells formed clusters around muscle fibers (J). Arrowheads co-localize the same region in I and J. Magnification is 100X (A and B) and 200X (C-J).

Infiltrating CD8+ cytotoxic cells in the DST + anti-CD154 group are activated as indicated by granzyme B and cytokine RT-PCRs.

Three months after transplantation, granzyme B mRNA expression was detected in the DST + anti-CD154 mAb group by semi-quantitative RT-PCR while no such expression was observed in the FK506 group (Figure 5.2). Moreover, within the DST + anti-CD154 group, there was no difference of granzyme B expression between the mice that accepted the transplanted cells and those that rejected the transplanted cells. Semi-quantitative RT-PCRs for Th-1 (IL-2 and Interferon- γ) or Th-2 (IL-4 and IL-10) cytokines were also performed. Significantly higher expressions of INF- γ and IL-10 mRNA were detected 3 months after transplantation in muscles of mice treated with DST + anti-CD154 mAb compared to the group treated with FK506 (Figure 5.2). Furthermore, in the DST + anti-CD154 treated group, INF- γ was expressed significantly more than IL-10. The expression of IL-10 or INF- γ was not correlated with mice that accepted or rejected the grafts (not shown).

The expression of these two cytokines was confirmed by immunohistochemistry with double staining for CD8+ cells in the muscles of DST + anti-CD154 treated mice and FK506 treated mice. In the DST + anti-CD154 treated group, all infiltrating CD8+ cells expressed INF- γ (Figure 5.3, A and B) or IL-10 (Figure 5.3, E and F) while in the FK506 treated group, the expression of these cytokines was detected, but very few infiltrating CD8+ positive cells were observed (Figure 5.3, I and J). Interestingly some regions, infiltrated with CD8+ cells, were negative for INF- γ staining (Figure 5.3, C and D) or IL-10 (Figure 5.3, G and H).

Treatment with anti-CD154 mAb prevented the formation of antibodies against the transplanted cells by the recipients up to three months post-transplantation.

The formation of antibodies against the donor myoblasts was inhibited in the mice that received the anti-CD154 mAb alone or in combination with DST and in the control group treated with FK506 up to three months after transplantation (Table 5.1). In the other

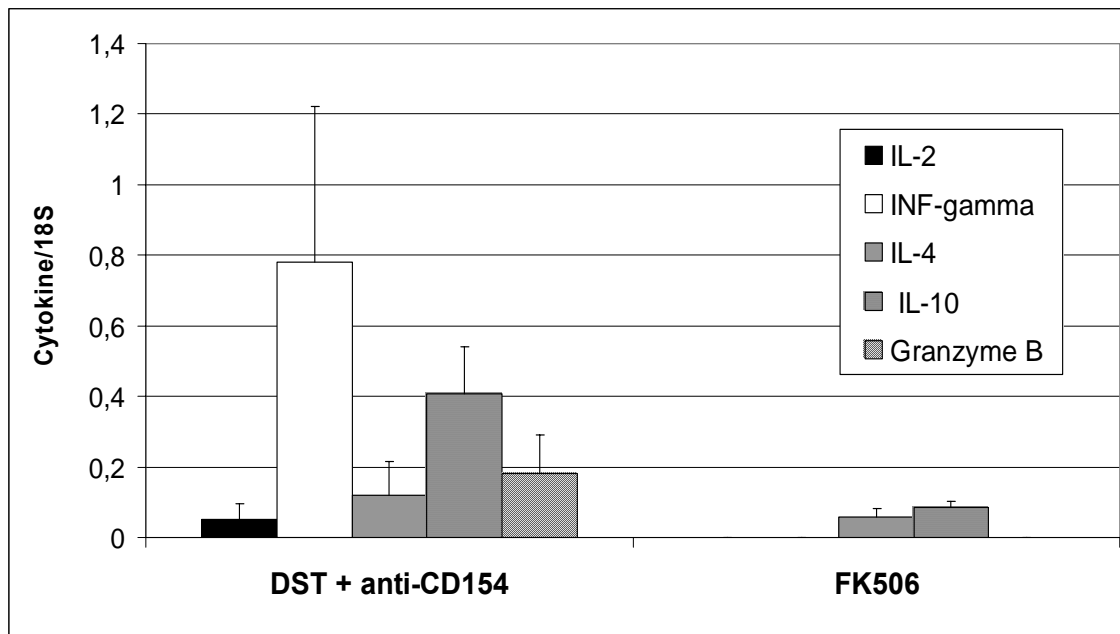


Figure 5.2: Semi-quantitative RT-PCR for cytokine profile and granzyme B. Significant increased expression of INF- γ and IL-10 was detected in muscles of mice treated with DST + anti-CD154 compared to the FK506 treated group (Fisher $p < 0.05$). The activation of infiltrating CD8⁺ lymphocytes is indicated by the granzyme B expression in muscles of mice treated with DST + anti-CD154.

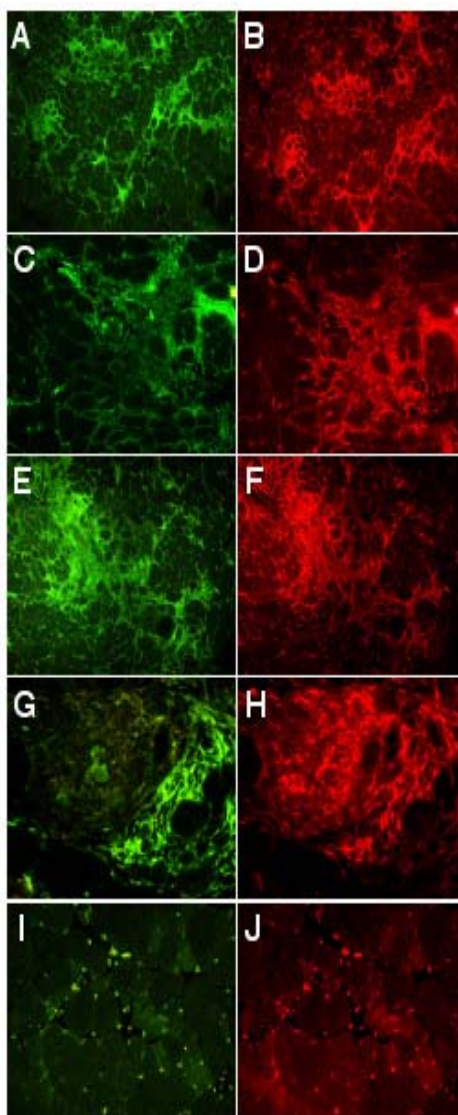


Figure 5.3: Immunohistochemical staining to confirm the expression of INF- γ and IL-10 in the muscle of mice treated with DST + anti-CD154. Three months after transplantation, INF- γ staining (A and C) with double staining for CD8⁺ (B and D) and IL-10 staining (E and G) with double staining for CD8⁺ (F and H) on a muscle section of mice treated with DST + anti-CD154 were performed. Not all infiltrating cells expressed INF- γ (C) or IL-10 (G). A few infiltrating lymphocytes in the muscles of mice immunosuppressed with FK506 were observed and expressed INF- γ (I) and CD8 (J). Magnification is 100X (A,B,E and F) and 200X (C, D, G, H, I and J).

groups, DST alone or no treatment, the hosts produced similar high levels of antibodies. Thus, the use of the anti-CD154 Ab blocked the activation of B cells. However, antibodies against the injected myoblasts were detected six months post-transplantation in 4 out of 5 mice in the group treated with DST + anti-CD154 (Table 5.1C).

Very low microchimerism was observed in the mice treated with DST + anti-CD154.

By using an antibody directed against the MHC class I (H-2^d) specific for the donor cells, no circulating lymphocytes or spleen cells were found to be of donor origin in the mice treated with DST + anti-CD154 three months post-transplantation (results not shown). Since this previous technique is not very sensitive for microchimerism detection, a quantitative PCR detection of Y chromosome was done in the group sacrificed six months post-transplantation. The Y genome was detected in all tissues (spleen, bone marrow, thymus, and liver) of mouse # 2 in the group treated with DST + anti-CD154 (Figure 5.4). Nevertheless, this mouse rejected the transplanted myoblasts. The other mouse in the same group (mouse # 5), which still expressed dystrophin, had microchimerism in all tissues except in the bone marrow. Thus, the prolongation of dystrophin expression was not correlated with the detection of microchimerism.

No persistence of the transplanted myoblasts in CD154 KO mice.

Myoblast transplantations were also done in CD154 KO mice to determine whether these mice could accept such graft in a complete absence of CD154-CD40 interactions. These mice were transplanted with transgenic TnI-LacZ primary myoblasts that express the β -galactosidase under the quail fast troponin I muscle specific promoter, thus only in differentiated muscle cells (32). The positive control group received a sustained immunosuppressive treatment with FK506. No β -galactosidase positive fibers were observed in the muscles of CD154 KO mice one month after transplantation while abundant β -galactosidase positive fibers were present in the FK506 treated group (Figure 5.5).

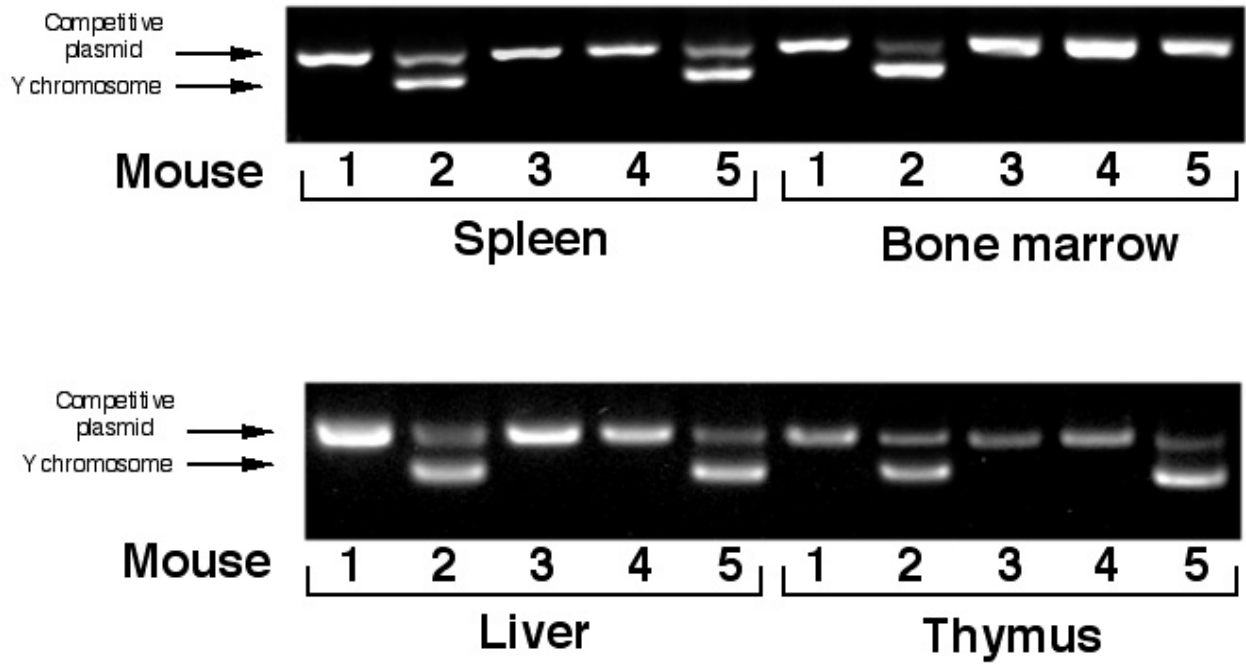


Figure 5.4: Microchimerism detection of male donor genomes by competitive PCR amplification of the Y chromosome. Very low microchimerism was detected in several tissues of mice treated with DST + anti-CD154 six months post-transplantation. Male genomes were detected in two mice of this group (mice 2 and 5). Mouse # 2, which rejected the graft, showed Y chromosome amplification in the spleen, the bone marrow, the thymus and the liver, while mouse #5, which accepted the graft, showed Y chromosome amplification in the same tissues except the bone marrow.

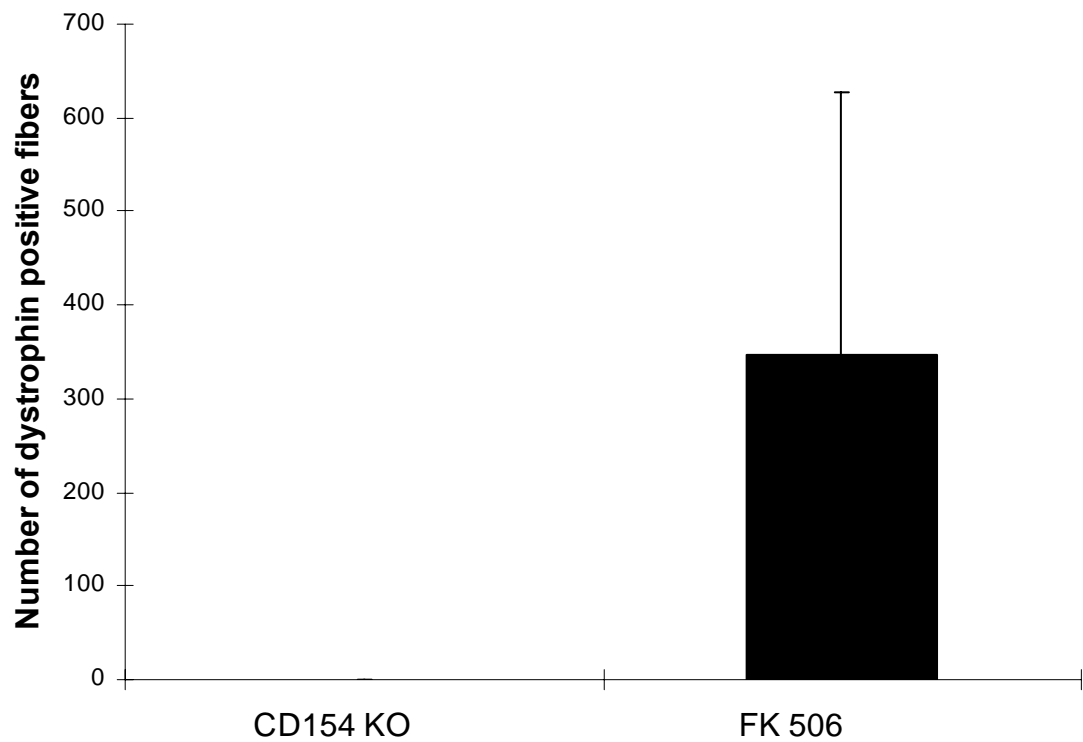


Figure 5.5: Graft results in CD154 KO mice. Mice were transplanted with TnI-LacZ myoblasts, which express the β -galactosidase only following formation of muscle fibers. No β -galactosidase positive fibers were found in CD154 KO mice (n = 5) while abundant β -galactosidase fibers were observed in the mice that received immunosuppressive treatment with FK506 (n = 4).

5.7 Discussion

The development of a tolerance state is an important goal in the field of transplantation. In the present case, myoblast transplantation is a promising therapeutic approach for Duchenne muscular dystrophy, but currently requires a sustained immunosuppression. To avoid the use of immunosuppression, this approach would require complete histocompatible donors for minor and major antigens, which is almost impossible in humans. Eventually, it may be possible to transplant genetically modified autologous myoblasts (see review (33)). An immune reaction against the transgene product is nevertheless possible, since the transplantation of normal syngenic myoblasts in the *mdx* mice triggered the production of antibodies against dystrophin (34). The same observation was made in some DMD patients participating to a clinical trial for myoblast transplantation (5). A sustained immunosuppressive treatment often produces adverse effects (35-37) and the impoverished conditions of DMD patients may accentuate these side effects.

Here, we report for the first time a sustained and high expression of dystrophin in muscles without any sustained immunosuppressive regimen after fully histoincompatible myoblast transplantation. This was generated by the use of a short course treatment consisting of a single DST at day -7 plus doses of anti-CD154 mAb at days -7, -4, 0 and +4, where day 0 correspond to the time of myoblast injections. Used separately, the DST or the anti-CD154 did not prevent the acute rejection of the transplanted myoblasts (Table 5.1). This means that the persistence of dystrophin expression in the DST + anti-CD154 mAb treatment groups was not only due to the constant presence of circulating anti-CD154 mAb in the blood, but rather to their combined action to inhibit rejection. The mechanisms involved in this prevention of early rejection and development of tolerance induced in other cases (19-22) is poorly understood. It has however been shown that the administration of anti-CD4 mAb abrogated tolerance induction, while this effect did not occur with an anti-CD8 mAb (38). Moreover, the treatment with DST + anti-CD154 showed deletion of alloreactive CD8⁺ T cells (24).

The development of a permanent state of tolerance towards donor antigens was not achieved in the present case of myoblast transplantation. Even though we observed, three

months after transplantation of normal myoblasts, the presence of dystrophin in many muscle fibers in 60% of the *mdx* mice treated with the DST + anti-CD154 protocol, this survival decreased to 20% six months post-transplantation, and our results suggested that there was a slow rejection process by the host immune system. First, an important infiltration of CD8+ cells was observed one month, three months and six months post-transplantation (Table 5.1 and Figure 5.1G and J), especially in the muscle of mice that still expressed dystrophin. These infiltrating cells formed clusters around muscle fibers, an histological sign of rejection (Figure 5.1J). Less infiltrating cells were observed in the mice that did not expressed dystrophin, probably because the rejection process was already completed. Secondly, semi-quantitative RT-PCRs revealed that the infiltrating cells expressed predominantly the cytokine INF- γ (Figure 5.2A) relative to IL-2, IL-4 and IL-10. These cytokines are produced by different CD4+ T cell subsets. The Th1 cytokines (INF- γ , IL-2) enhance cellular immunity while Th2 cytokines (IL-4, IL-10) promote antibody production and phagocytosis (39-41). Finally, lymphocyte activation was confirmed by semi-quantitative RT-PCRs for granzyme B expression (Figure 5.2B). Granzyme B and the perforin proteins are expressed in activated but not resting cytotoxic lymphocytes (42, 43).

No antibodies against the donor cells were detected in the groups treated with the anti-CD154 mAb alone or with the DST + anti-CD154 mAb one month and three months after transplantation (Table 5.1). In the group, which received the antibody alone, cellular immune reaction was responsible for the rejection of the transplanted cells. This suggests that the anti-CD154 mAb prevented the activation of B cells but not the cellular rejection mediated by CD8+ cytotoxic T cells. However, the production of antibodies against the transplanted cells appeared only six months after transplantation.

Two hypothesis could explain the late production of antibodies against the donor cells and the diminution of graft survival over a long period: 1) newly formed CD4+ T helper lymphocytes or B lymphocytes that reacted against the donor antigens and 2) reactivity against muscle-specific antigens that appeared only in mature muscle fibers.

Lymphocytes that were produced and matured after the treatment using DST + anti-CD154 were selected in the thymus by recipient APC, in absence of chimerism in this tissue. These new lymphocytes could react with donor MHCs and triggered rejection of

hybrid myofibers. The low rate of lymphocyte production could explain the long delay of rejection. Moreover, these donor-reactive lymphocytes would have to escape the action of suppressor cells that act to block rejection of donor cells (44). Some reports showed that “infectious tolerance” can be achieved using CD154 blockade in combination with depleting anti-CD4 or anti-CD8 mAbs (45, 46). But there is no evidence of development of suppressor cells using DST + anti-CD154.

The other hypothesis proposed is the involvement of muscle-specific antigens that are polymorphic between mice. These antigens are produced only after complete differentiation and maturation of the muscle fibers. In the present case, the dystrophin is absent in *mdx* mice and is also not expressed in myoblasts at the time of transplantation. Another major fact that favors this hypothesis is the absence of MHC class I and II expression on quiescent mature muscle fibers (47, 48). MHCs are found on muscle fibers only following stimulation by inflammatory cytokines or muscle regeneration. In absence of MHCs, internal antigens are not presented and cannot be recognized by the immune system. In this case, rejection can only occur when muscle fibers are regenerating. It is unlikely that dystrophin can cause muscle fiber rejection since graft success of syngeneic myoblast transplantation in *mdx* mice was observed up to 8 months after transplantation (34). In that case, antibodies against dystrophin were produced by 50 % of mice, without leading to a rejection of the muscle fibers.

The use of a DST is crucial for prolongation of graft survival in the present experiments. It is hypothesized that DST permits the presentation of alloantigens to the host for activation of specific T-helper cells while co-activation is blocked by anti-CD154 mAb (23). We observed very low microchimerism in several tissues involved in the immune system of the recipient treated with DST + anti-CD154 mAb six months after transplantation (Figure 5.4). Microchimerism did not seem to be involved in the prolongation of graft survival since this microchimerism was observed in one mouse that rejected the myoblasts and in one mouse that accepted the grafted cells. A higher level of chimerism (i.e. macrochimerism) would probably be required to establish permanent immune tolerance (49).

CD154 KO mice fail to mount secondary antigen-specific responses to immunization with a thymus-dependent antigen (50), but these mice can reject allogeneic grafts such as bone marrow transplants (J. Kutz et al, submitted5) when recipients are not depleted of CD8+ lymphocytes. Our graft results in CD154 KO mice showed complete acute rejection of the transplanted myoblasts one month after their injection (Figure 5.4). The complete inhibition of CD40-CD154 interactions, in this mouse model, was not sufficient to inactivate responsive lymphocytes and graft rejection still occurred. This result clearly demonstrates that the activation of lymphocytes and the modulation of an effective immune response against allogeneic tissues can happen without CD154-CD40 interactions.

In conclusion, the tolerance-inducing protocol consisting of DST + anti-CD154 mAb treatments significantly prolonged the expression of dystrophin in a DMD mouse model after transplantation of myoblasts. The effectiveness of this protocol for tolerance development for myoblast transplantation must be further investigated to clarify the pending hypothesis. Further modification of this protocol will include strategies to negatively select newly formed donor reactive lymphocytes or lymphocytes that react with muscle-specific antigens, to permit long term tolerance.

5.8 References

1. Alameddine HS, Fardeau M. Regeneration of skeletal muscle induced by satellite cell grafts. *Adv Exp Med Biol* 1990; 280: 159.
2. Karpati G, Pouliot Y, Zubrzycka-Gaarn E, et al. Dystrophin is expressed in *mdx* skeletal muscle fibers after normal myoblast implantation. *Am J Pathol* 1989; 135 (1): 27.
3. 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 (6203): 176.
4. Huard J, Roy R, Bouchard JP, Malouin F, Richards CL, Tremblay JP. Human myoblast transplantation between immunohistocompatible donors and recipients produces immune reactions. *Transplant Proc* 1992; 24 (6): 3049.
5. Roy R, Tremblay JP, Huard J, Richards C, Malouin F, Bouchard JP. Antibody formation after myoblast transplantation in Duchenne- dystrophic patients, donor HLA compatible. *Transplant Proc* 1993; 25 (1 Pt 2): 995.
6. Guerette B, Asselin I, Vilquin JT, Roy R, Tremblay JP. Lymphocyte infiltration following allo- and xenomyoblast transplantation in mice. *Transplant Proc* 1994; 26 (6): 3461.
7. Irintchev A, Zweyer M, Wernig A. Cellular and molecular reactions in mouse muscles after myoblast implantation. *J Neurocytol* 1995; 24 (4): 319.
8. Rossini AA, Greiner DL, Mordes JP. Induction of immunologic tolerance for transplantation. *Physiol Rev* 1999; 79 (1): 99.
9. Parker DC, Greiner DL, Phillips NE, et al. Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92 (21): 9560.
10. Rossini AA, Parker DC, Phillips NE, et al. Induction of immunological tolerance to islet allografts. *Cell Transplant* 1996; 5 (1): 49.
11. Markees TG, Phillips NE, Noelle RJ, et al. Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand. *Transplantation* 1997; 64 (2): 329.

12. Markees TG, Appel MC, Noelle RJ, Mordes JP, Greiner DL, Rossini AA. Tolerance to islet xenografts induced by dual manipulation of antigen presentation and co-stimulation. *Transplant Proc* 1996; 28 (2): 814.
13. Kenyon NS, Chatzipetrou M, Masetti M, et al. Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96 (14): 8132.
14. Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, et al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 1992; 357 (6373): 80.
15. Roy M, Waldschmidt T, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ. The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4+ T cells. *J Immunol* 1993; 151 (5): 2497.
16. Hermann P, Van-Kooten C, Gaillard C, Banchereau J, Blanchard D. CD40 ligand-positive CD8+ T cell clones allow B cell growth and differentiation. *Eur J Immunol* 1995; 25 (10): 2972.
17. Sad S, Krishnan L, Bleackley RC, Kagi D, Hengartner H, Mosmann TR. Cytotoxicity and weak CD40 ligand expression of CD8+ type 2 cytotoxic T cells restricts their potential B cell helper activity. *Eur J Immunol* 1997; 27 (4): 914.
18. Gauchat JF, Henchoz S, Mazzei G, et al. Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature* 1993; 365 (6444): 340.
19. Chen C, Nabavi N. In vitro induction of T cell anergy by blocking B7 and early T cell costimulatory molecule ETC-1/B7-2. *Immunity* 1994; 1 (2): 147.
20. Jenkins MK, Schwartz RH. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med* 1987; 165 (2): 302.
21. Schwartz RH. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 1992; 71 (7): 1065.
22. Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 111.
23. Rossini AA, Mordes JP, Markees TG, Phillips NE, Gordon EJ, Greiner DL. Induction of islet transplantation tolerance using donor specific transfusion and anti-CD154 monoclonal antibody. *Transplant Proc* 1999; 31 (1-2): 629.

24. Iwakoshi NN, Mordes JP, Markees TG, Phillips NE, Rossini AA, Greiner DL. Treatment of allograft recipients with donor-specific transfusion and anti-CD154 antibody leads to deletion of alloreactive CD8⁺ T cells and prolonged graft survival in a CTLA4-dependent manner [In Process Citation]. *J Immunol* 2000; 164 (1): 512.
25. Cossu G, Zani B, Coletta M, Bouche M, Pacifici M, Molinaro M. In vitro differentiation of satellite cells isolated from normal and dystrophic mammalian muscles. A comparison with embryonic myogenic cells. *Cell Differ* 1980; 9 (6): 357.
26. Wakeford S, Watt DJ, Partridge TA. X-irradiation improves mdx mouse muscle as a model of myofiber loss in DMD. *Muscle Nerve* 1991; 14 (1): 42.
27. Harris JB, Johnson MA, Karlsson E. Proceedings: Histological and histochemical aspects of the effect of notexin on rat skeletal muscle. *Br J Pharmacol* 1974; 52 (1): 152P.
28. Foy TM, Shepherd DM, Durie FH, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ. In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. II. Prolonged suppression of the humoral immune response by an antibody to the ligand for CD40, gp39. *J Exp Med* 1993; 178 (5): 1567.
29. Noelle RJ, Roy M, Shepherd DM, Stamenkovic I, Ledbetter JA, Aruffo A. A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89 (14): 6550.
30. Guerette B, Roy R, Tremblay M, et al. Increased granzyme B mRNA after alloincompatible myoblast transplantation. *Transplantation* 1995; 60 (9): 1011.
31. Caron NJ, Chapdelaine P, Tremblay JP. Male-specific competitive PCR for the quantification of transplanted cells in mice. *Biotechniques* 1999; 27 (3): 424.
32. Hallauer PL, Bradshaw HL, Hastings KE. Complex fiber-type-specific expression of fast skeletal muscle troponin I gene constructs in transgenic mice. *Development* 1993; 119 (3): 691.
33. Skuk D, Tremblay JP. Progress in myoblast transplantation: a potential treatment of dystrophies. *Microsc Res Tech* 2000; 48 (3-4): 213.
34. Vilquin JT, Wagner E, Kinoshita I, Roy R, Tremblay JP. Successful histocompatible myoblast transplantation in dystrophin- deficient mdx mouse despite the production of antibodies against dystrophin. *J Cell Biol* 1995; 131 (4): 975.

35. Bennett WM. The nephrotoxicity of new and old immunosuppressive drugs. *Ren Fail* 1998; 20 (5): 687.
36. Tanabe K, Koga S, Takahashi K, et al. Diabetes mellitus after renal transplantation under FK 506 (tacrolimus) as primary immunosuppression. *Transplant Proc* 1996; 28 (3): 1304.
37. Neu AM, Furth SL, Case BW, Wise B, Colombani PM, Fivush BA. Evaluation of neurotoxicity in pediatric renal transplant recipients treated with tacrolimus (FK506). *Clin Transplant* 1997; 11 (5 Pt 1): 412.
38. Markees TG, Phillips NE, Gordon EJ, et al. Long-term survival of skin allografts induced by donor splenocytes and anti-CD154 antibody in thymectomized mice requires CD4(+) T cells, interferon-gamma, and CTLA4. *J Clin Invest* 1998; 101 (11): 2446.
39. Smith KA. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 1988; 240 (4856): 1169.
40. Doherty PC. Cell-mediated cytotoxicity. *Cell* 1993; 75 (4): 607.
41. Halloran PF. Interferon-gamma, prototype of the proinflammatory cytokines-- importance in activation, suppression, and maintenance of the immune response. *Transplant Proc* 1993; 25 (2 Suppl 1): 10.
42. Clement MV, Legros-Maida S, Israel-Biet D, et al. Perforin and granzyme B expression is associated with severe acute rejection. Evidence for in situ localization in alveolar lymphocytes of lung-transplanted patients. *Transplantation* 1994; 57 (3): 322.
43. Garcia-Sanz JA, MacDonald HR, Jenne DE, Tschopp J, Nabholz M. Cell specificity of granzyme gene expression. *J Immunol* 1990; 145 (9): 3111.
44. Qin S, Cobbold SP, Pope H, et al. "Infectious" transplantation tolerance. *Science* 1993; 259 (5097): 974.
45. Graca L, Honey K, Adams E, Cobbold SP, Waldmann H. Cutting edge: anti-CD154 therapeutic antibodies induce infectious transplantation tolerance. *J Immunol* 2000; 165 (9): 4783.
46. Honey K, Cobbold SP, Waldmann H. CD40 ligand blockade induces CD4+ T cell tolerance and linked suppression. *J Immunol* 1999; 163 (9): 4805.

47. Appleyard ST, Dunn MJ, Dubowitz V, Rose ML. Increased expression of HLA ABC class I antigens by muscle fibres in Duchenne muscular dystrophy, inflammatory myopathy, and other neuromuscular disorders. *Lancet* 1985; 1 (8425): 361.
48. Karpati G, Pouliot Y, Carpenter S. Expression of immunoreactive major histocompatibility complex products in human skeletal muscles. *Ann Neurol* 1988; 23 (1): 64.
49. Wekerle T, Sykes M. Mixed chimerism as an approach for the induction of transplantation tolerance. *Transplantation* 1999; 68 (4): 459.
50. Renshaw BR, Fanslow WC, 3rd, Armitage RJ, et al. Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice. *J Exp Med* 1994; 180 (5): 1889.

Chapitre 6. Induction de tolérance à la transplantation de myoblastes en développant un chimérisme mixte à l'aide d'un protocole non-myeloablatif

Ce chapitre présente le deuxième de trois articles scientifiques de cette thèse et détaille les résultats de transplantation de myoblastes obtenus en développant une tolérance immunologique centrale. La majorité des auteurs secondaires de cet article ont participé de manière technique à l'exécution des transplantations. Dans le cas de Luc Vallière et de Simon Quenneville, ces auteurs ont effectués les transplantations utilisant des souris eGFP positives (Figure 6.3). Josef Kurtz était un étudiant au doctorat au laboratoire de Megan Sykes à Boston, et il a contribué à ma formation pour l'exécution de greffes de moelle osseuse, de greffes de peaux. Cet article a été accepté pour publication à la revue *The American Journal of Transplantation*, février 2004.

6.1 Résumé

Le rejet immunologique demeure la principale barrière à l'application clinique de la transplantation de myoblastes, qui peut cependant être évité en développant la tolérance. Connaissant les pauvres résultats d'induction de tolérance périphérique obtenus, nous avons tourné notre attention vers l'induction de tolérance centrale. Nous avons donc utilisé un protocole non-myeloablatif efficace de greffe de moelle osseuse. Brièvement, le protocole consistait en une faible dose d'irradiation totale corporelle (3 Gy) au jour -1, une injection d'anti-CD8 (2,43; 0,7 mg) additionnée d'une dose d'anti-CD154 (MR1 ; 0,5 mg) au jour 0. La transplantation de cellules de moelle osseuse (« bone marrow transplantation » ; BMT) de donneurs semi-allogéniques (B10xBALB/c ; H-2^{bd}) ou de donneurs complètement allogéniques (BALB/c; H-2^d) a été effectuée au jour 0. La transplantation de myoblastes a été exécutée à différents temps après la BMT et la transplantation de peau au jour +2 ou +6. Avec ce protocole non-myeloablatif, nous avons obtenu un niveau élevé de chimérisme mixte de sang périphérique ($61,4 \pm 34,5\%$) observé au delà de 150 jours en utilisant des donneurs semi-allogéniques chez 91% des souris *mdx* traitées. Toutes les souris chimériques ont démontré une tolérance à long terme (> 90 jours) à la transplantation de myoblastes, de peau et à une seconde transplantation de myoblastes du même donneur. Cependant, en utilisant des donneurs complètement allogéniques, la plupart des souris ont développé un chimérisme transitoire qui a mené à une expression de dystrophine chez environ 50% des souris traitées. Par contre, le chimérisme transitoire obtenu chez certaines souris a permis d'induire la survie à long terme d'une deuxième transplantation de myoblastes, mais pas la survie de greffes de peau. En conclusion, nous avons obtenu des résultats sans précédent qui démontrent que l'induction de tolérance à la transplantation de myoblastes est possible en visant le système immunitaire central.

6.2 Titre: Tolerance to myogenic cell transplantation in murine mixed allogeneic chimeras induced by non-myeloablative conditioning¹

Geoffrey Camirand², Joël Rousseau², Mélanie K. Sackett², Nicolas J. Caron², Philippe Mills², Simon P. Quenneville², Luc Vallières², Josef Kurtz³, Megan Sykes³ and Jacques P. Tremblay¹

¹This work was financially supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM), the Muscular Dystrophy Association of Canada (MDAC) and the Canadian Institute of Health Research (CIHR).

²Unité de Génétique Humaine, Centre de Recherche du CHUL, Université Laval, Québec, Canada.

³Bone Marrow Transplantation Section, Transplantation Biology Research Center, Massachusetts General Hospital/Harvard Medical School, Boston, MA 02129, USA.

Corresponding author:

Jacques P. Tremblay, Ph.D., Université Laval, Unité de Génétique humaine, Centre Hospitalier de l'Université Laval, 2705 boul. Laurier, RC-9300, Ste-Foy (Qc) Canada G1V 4G2.

fax: 418-654-2207

tel: 418-654-2186

tel: 418-656-4141 ext. 7307

Jacques-P.Tremblay@crchul.ulaval.ca

Running title: Tolerance to myogenic cell transplantation

6.3 ABSTRACT

Myogenic cell transplantation (also called myoblast transplantation) is a promising therapy for Duchenne Muscular Dystrophy, a fatal genetic disease for which no efficient treatment exists to date. Immunological rejection remains the main barrier but could be circumvented by the development of immunological tolerance. To induce tolerance, we used a non-myeloablative protocol that include costimulatory blockade and was previously shown to permit allogeneic bone marrow engraftment and specific tolerance. Briefly, C57BL/10J *mdx* mice (H-2^b) received this non-myeloablative conditioning, a bone marrow transplantation (day 0) from a haplo-allogeneic B10xBALB/c (H-2^{bd}) or fully allogeneic donor (BALB/c; H-2^d) and donor-type myoblast or skin grafts. Using haplo-allogeneic BMT donors, we obtained a high level of mixed chimerism lasting >150 days in 91% of the treated mice, which resulted in tolerance to first and second donor myoblast transplants and donor skin grafts. Using fully allogeneic donors, mostly transient chimerism was obtained, which led to tolerance to donor-type myoblast grafts in near 65% of the treated mice. In conclusion, we have obtained unprecedented results showing long-term survival of allogeneic myoblast transplants without the use of long-term immunosuppressants using a non-myeloablative protocol with CD154 blockade to induce bone marrow engraftment.

6.4 Introduction

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is an inherited disease caused by a mutation in the dystrophin gene, leading to gradual muscle weakness and death in the early twenties (1). Unfortunately, no effective treatment exists for these patients. By restoring dystrophin expression in skeletal muscle fibers, one could improve resistance of these fibers to damage, and consequently, improve the quality of life of young boys with DMD (2).

One effective way to restore dystrophin expression in diseased muscle fibers is by directly injecting normal muscle precursor cells (myoblasts) into skeletal muscles of DMD patients. Myogenic cell (or myoblast) transplantation, has been well demonstrated in mouse models and non-human primates (3-5).

Unfortunately, immunological rejection remains one of the main barriers to clinical application of myoblast transplantation, and sustained immunosuppression is currently required to avoid rejection (6, 7). Despite improvements in immunosuppressive drugs, many problematic side effects are still associated with chronic immunosuppression, which are not suitable for young and debilitated DMD patients. The ideal for this therapy would be the induction of immunological tolerance (i.e. donor-specific alloantigen unresponsiveness). However, myoblast transplantation has been shown to be very immunogenic and has proved resistant to peripheral tolerance induction ((8) and manuscript in preparation).

The concept of tolerance induction through mixed chimerism relies on strong preclinical and clinical demonstration of its effectiveness. Permanent chimerism was shown to induce permanent skin allograft acceptance in rodents, which is the most stringent experimental test for tolerance (9). Moreover, evidences of tolerance through hemopoietic chimerism in humans have already been demonstrated in humans. Indeed, patients who received allogeneic bone marrow transplantation (BMT) for haematological malignancies, and who were later transplanted with a kidney (10-13) or a lobe of a lung (14), from the same bone marrow (BM) donor, showed long-term acceptance of these organ grafts without chronic immunosuppression. Recent studies of combined, simultaneous non-myeloablative bone marrow and kidney transplantation have shown that tolerance can be induced with this

approach (15, 16). Tolerance induction through permanent mixed chimerism is attributed to the basic self-tolerance development by intra-thymic clonal selection; and to the inactivation and deletion of donor-reactive T cells in the periphery. Many non-myeloablative experimental protocols were developed for BM engraftment and donor-specific tolerance using costimulatory blocking reagents, aiming at reducing toxicity (9, 17, 18). It is also possible to completely avoid any form of cytoreduction to induce chimerism and specific tolerance by transplanting high doses of allogeneic BM cells along with costimulatory blockade (19, 20). However, these supra-physiological doses of BM cells would necessitate, in humans, intense mobilization of peripheral blood stem cells from a living donor, or in vitro hematopoietic stem cell expansion (21). Graft-versus-host disease is avoided with these approaches because the donor T cells are exposed to the same tolerance-inducing agents in vivo as the much larger number of recipient T cells.

To induce tolerance, we used a non-myeloablative protocol that included a low dose of total body irradiation (3 Gy) and one dose of anti-CD154 and of anti-CD8 antibodies, previously shown to induce specific tolerance to skin transplantation (17). We obtained reliable and long-lasting mixed chimerism and tolerance to haplo-allogeneic myoblast transplantation. Using this same haplo-allogeneic donor, we also demonstrated long-term survival of skin transplantation and long-term survival of a second myoblast transplant from the same donor. However, using fully allogeneic donors, we obtained only transient chimerism in most of the mice, which led to variable long-term survival of myoblast transplantation. Interestingly, transient chimerism was able to induce, in some cases, long-term survival of a second myoblast transplant, but not skin allograft survival.

6.5 Materials and methods

Animals

BALB/c mice (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine; H-2^d) or the first generation of a cross between BALB/c and C57BL/10J (B10; H-2^b; Jackson Laboratory) mice (B10xBALB/c; H-2^{bd}) were used as fully allogeneic and haplo-allogeneic donors. CD1 mice (outbred) were used as third party donors for skin grafts. C57BL/10J mdx/mdx (H-2^b) mice, a model of Duchenne Muscular Dystrophy, were used as recipients. C57BL/6J (B6) mice and hemizygous transgenic mice (GFP-B6) were obtained from Jackson Laboratory. New Zealand white rabbits were from Charles River Laboratories (Montréal, Canada). All mice were housed in sterile micro-isolators with free access to food and water. All experiments were conducted in accordance the Laboratory Animal Care and Use Ethics Committee of Laval University.

Bone marrow transplantation (BMT)

Lethal TBI experiments: Age-matched (2-4 months old) recipient mdx mice received a lethal dose (9 Gy; X rays linear accelerator, 6MV photon beam energy; Siemens, Malvern, PA) of TBI on day -1 and a BMT (10×10^6 BM cells) on day 0 from B10xBALB/c + mdx, BALB/c + mdx or BALB/c donors alone. Bone marrow cells were depleted of lymphocytes using anti-Thy-1 mAb (Noemarker, Fremont, CA) and rabbit complement (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada), and injected into the caudal vein of recipient mice.

Non-myeloablative experiments: Age-matched (2-4 months old) recipient mdx mice received a low dose (3 Gy) of TBI on day -1 and a BMT ($16-18 \times 10^6$ BM cells) on day 0 from B10xBALB/c or BALB/c donors. Recipient mice also received one dose of each anti-CD8 (2.43; 700 µg; i.p.; Bio Express, West Lebanon, NH) and anti-CD154 (MR1; 500 µg; i.p.; Bio Express) mAbs on days -1 and 0 respectively.

GFP experiment: B6 mice were lethally irradiated (10 Gy) followed by a BMT (5×10^6 BM cells) from GFP-B6 or non-GFP (B6) mice. Six months after BMT, mice were anaesthetized and transcardially perfused with 10 ml of saline containing 10 U/ml of

heparin, followed by ice-cold 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (pH 7.4) over 10 min.

Primary mouse myoblast culture

Newborn BALB/c or B10xBALB/c mice were used for primary myoblast cultures as previously described (22). Briefly, muscles from the arms and legs were dissociated at 37°C with collagenase (600 IU/ml; Sigma, St-Louis, MO) and dispase II (2 mg/ml; Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada) for 1 hr in HBSS. The cell suspension was grown in DMEM (Gibco, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 15% fetal calf serum (FCS; Gibco) and a mixture of penicillin G and streptomycin (Gibco), and frozen until transplantation.

Myoblast transplantation (MT) and skin transplantation

Left and right hind legs of mdx mice were irradiated (15 Gy) to inhibit host myoblast proliferation at least 21 days prior to BMT (23). Prior to injection, $1-2 \times 10^6$ myoblasts were resuspended in 10 μ l of notexin venom (5 μ g/ml), to induce muscle fiber necrosis without affecting the blood vessels and nerve endings (24). The right or left Tibialis anterior (TA) was surgically exposed and myoblasts were injected in several sites throughout the entire muscle. In each experiment, a positive control group for MT received FK506 (Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd, Osaka, Japan) intra-peritoneally at 2.5 mg/kg/d from day 0 until the day of sacrifice.

Roughly 1 cm² full thickness tail skins from B10xBALB/c or BALB/c, and third party (CD1) mice were grafted on the dorsal thoracic wall, sutured with 5-0 silk and bandaged for one week. Daily visual inspections were performed for two weeks and weekly afterward. Skin grafts were considered rejected when less than 10% of the graft remained viable.

Flow cytometric analysis of chimerism

Chimerism was evaluated by flow cytometric analysis of peripheral blood as described (25). Briefly, forward angle and 90° light scatter were used to distinguish lymphocytes in peripheral white blood cells (WBC). Cells were stained with anti-H-2D^d-FITC (BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada) to detect donor cells, anti-CD90-PE (Caltag, San Francisco, CA) and anti-CD8-Cy-chrome or anti-CD4-Cy-chrome (BD Biosciences). Non-specific FcR binding was blocked by anti-mouse CD16/CD32 mAb (BD Biosciences) prior to staining. Isotype matched controls were used in each analysis. The percentage of donor cells was calculated by subtracting control staining from quadrants containing donor and host cells expressing a particular lineage marker, and by dividing the net percentage of donor cells by the total net percentage of donor plus host cells of that lineage.

Immunohistochemical detection of dystrophin and of CD4+ and CD8+ lymphocytes

Tibialis anteriors previously injected with myoblasts were embedded in OCT (Miles Inc., Elkhart, IN), frozen in liquid nitrogen and serially sectioned at 10 µm using a cryostat (Microm, Walldorf, Germany) as described (7). Non-specific binding was blocked by incubating the cryostat sections with 10% FBS in PBS, and then incubated with rabbit anti-dystrophin and goat anti-rabbit IgG conjugated with Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Dystrophin positive fibers were formed by fusion of injected donor myoblasts with dystrophin negative host muscle fibers. Survival of these dystrophin positive fibers indicates the absence of rejection. To compare survival of dystrophin positive fibers between experiments, results are expressed as ratios. Ratios were established for each experimental mouse by counting the maximum number of dystrophin positive muscle fibers on an entire muscle section divided by the mean maximum number of dystrophin positive muscle fibers of entire muscle sections of mice that received sustained immunosuppression with FK506 (positive control group) for that particular experiment.

To evaluate lymphocyte infiltration, muscle sections were incubated with a rat anti-CD4 antibody (clone GK 1.5; ATCC, Rockville, MD) or a rat anti-CD8 antibody (clone YTS 169; gift from Dr. H. Waldmann, Oxford University, Oxford, UK), and a biotin-

conjugated rabbit anti-rat antibody (1:300; Dako, Mississauga, Ontario, Canada), followed by streptavidin-peroxidase (1:300, Dako) as described (7). Peroxidase activity was revealed using 3,3'-diaminobenzidine (1 mg/ml; Sigma). Lymphocyte infiltration was assessed by counting the maximum number of stained cells on an entire muscle section.

Production of anti-dystrophin serum

A peptide containing 10 amino acids of the C-terminal dystrophin protein (PGKPMREDTM) and a cysteine at the C-terminal end was synthesized (Service de Synthèse de Peptides de l'Est du Québec, Québec, Canada) and coupled with keyhole limpet hemocyanin, according to the manufacturer's instructions (Pierce, Rockford, IL). Two New Zealand white rabbits were injected subcutaneously 5 times at 3 week intervals with the peptide mixed 1:1 (vol/vol) with Freund's incomplete adjuvant (Sigma). Titers were determined by ELISA against the synthesized dystrophin peptide. Specificity of each serum was assessed by staining mouse muscle sections from mdx and normal mice.

Statistical analysis

ANOVA test was used for statistical analysis using the Stat View software (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) and p values < 0.01 were considered statistically significant. Kaplan-Meier estimate was used for skin survival curves.

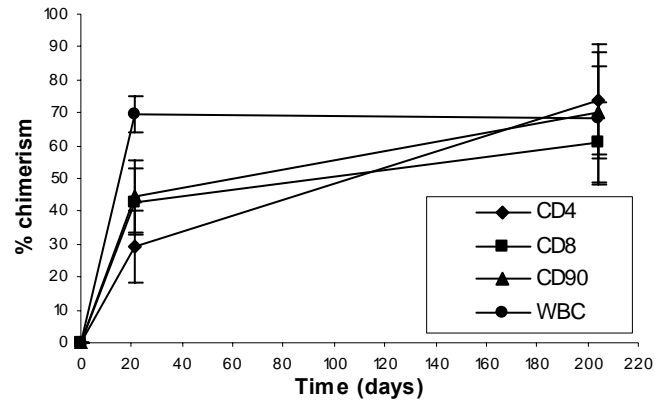
6.6 Results

Chimerism achieved with lethal TBI leads to long-term myoblast survival.

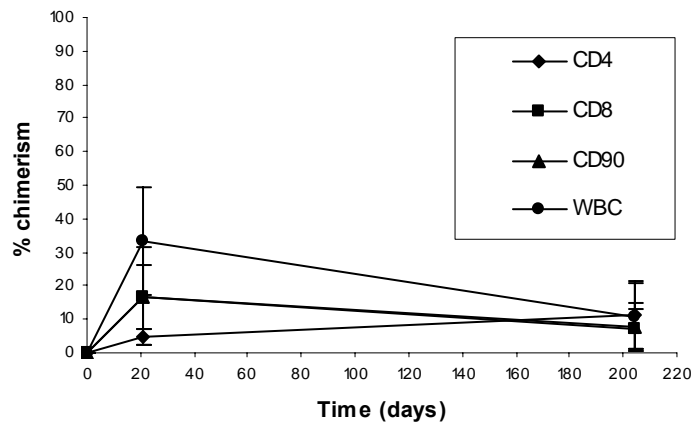
To induce mixed chimerism, we used lethal TBI (9 Gy) and transplanted either a mixture of B10xBALB/c + mdx, BALB/c + mdx, or only BALB/c BM cells to mdx mice. Long-term macrochimerism was observed in the major lymphoid lineages. However, results were variable, depending on the type of donor and on the proportion of donor BM cells. Indeed, in recipients of B10xBALB/c + mdx BM cells (1:1 proportion), a high and reliable level of chimerism was achieved in 4 of 4 mice ($68.3 \pm 19.8\%$ of total white blood cells (WBC) >200 days; Figure 6.1A). As shown in Figure 6.1B, using a mixture of BALB/c + mdx BM cells (1:1 proportion) resulted in lower levels of long-term chimerism ($10.9 \pm 10.4\%$ of WBC >200 days) than the mixture of B10xBALB/c + mdx BM cells (Figure 6.1A). Moreover, 2 out of 5 mice in the group that received BALB/c + mdx BMT did not develop long-term chimerism: one had no chimerism 21 days after BMT while the other developed transient chimerism (10.0% at 21 days and 0.0% at 204 days after BMT). However, transplantation of a higher ratio of BALB/c to mdx (7:3 instead of 1:1) or transplantation of BALB/c BM cells alone resulted in higher long-term chimerism (respectively $51.0 \pm 23.4\%$ at 160 days ($n = 10$; data not shown); and $99.0 \pm 0.3\%$ at 160 days (Figure 6.1C; $n = 4$)). In experiments using lethal TBI, two mice died of unknown causes and were excluded from analysis.

All mice received a donor-type myoblast transplant (MT) either 50 days (Lethal total body irradiation (LTBI) group 3; Table 6.1) or 75 days (LTBI groups 1 and 2; Table 6.1) after BMT. To permit myoblast engraftment comparison between experiments, the data in Figure 6.2 are presented as myoblast graft success ratios in Table 6.1. All chimeric mice were tolerant to donor-type MT (>110 days after MT), as observed by a high number of dystrophin positive fibers (Figure 6.2), resulting in high myoblast graft success ratios (Table 6.1; LTBI experiments). The two mice that did not develop long-term chimerism (Table 6.1, LTBI group 2; and Figure 6.2B, mice 2A and 2D) had low ratios of myoblast graft success: 0.11 for the non-chimeric mouse and 0.30 for the transiently chimeric mouse.

A



B



C

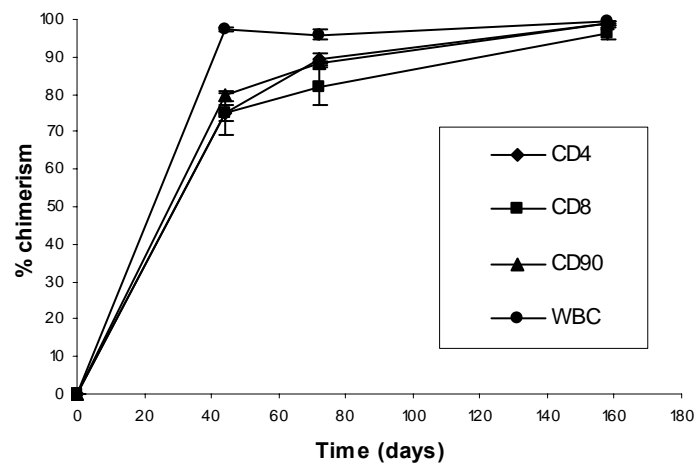


Figure 6.1: Mean percentage (\pm SD) of donor WBC over time obtained by lethal irradiation and BM reconstitution of mdx mice using BM cells from: A) B10xBALB/c + mdx (1:1 proportion), B) BALB/c + mdx (1:1 proportion), or C) BALB/c alone. The donor cells were identified by flow cytometric detection of donor MHC (H2-d).

Table 6.1. Myoblast transplantation and lymphocytic infiltration results

Experiments	Groups	n	Treatments [†]	BMT donor	Long-term chimerism (> 90 days)	MT donor	Time after MT (days)	Myoblast graft success ratio [‡]	Mean graft success ratio	Lymphocytic infiltration	
										CD4	CD8
Lethal TBI (LTBI)	1	4	LTBI + BMT	<i>mdx</i> + B10xBALB/c	4/4	B10xBALB/c	129	0.68, 1.50, 2.71, 3.20	2.02	194 ± 147	138 ± 76
	2	5	LTBI + BMT	<i>mdx</i> + BALB/c	3/5	BALB/c	129	0.11 [♠] , 0.30*, 1.49, 2.37, 2.80	1.41	240 ± 123	189 ± 131
	3	4	LTBI + BMT	BALB/c	4/4	BALB/c	112	0.75, 1.02, 1.19, 1.39	1.09	83 ± 18	78 ± 37
Non-myeloablative (NM)	1	8	TBI + BMT + anti-CD154 + anti-CD8	B10xBALB/c	7/8	B10xBALB/c	91	0.70, 0.79, 0.85*, 0.90, 1.06, 1.18, 1.21, 1.39	1.01	486 ± 151 [§]	587 ± 147 [§]
	2	6	TBI + BMT + anti-CD154 + anti-CD8	BALB/c	2/6	BALB/c	111	0.02*, 0.02*, 0.02*, 0.58*, 0.72, 1.55	0.48	221 ± 137	236 ± 143
	3	5	TBI + anti-CD154 + anti-CD8	NA	NA	B10xBALB/c	92	0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.04	0.03	ND	ND
	4	5	TBI + BMT	B10xBALB/c	0/5	B10xBALB/c	92	0.01, 0.02, 0.02, 0.04, 0.05	0.03	ND	ND
	5	5	Untreated	NA	NA	B10xBALB/c	92	0.00, 0.00, 0.01, 0.01, 0.01	0.01	ND	ND

[†]; TBI: total body irradiation; BMT: bone marrow transplantation.

[‡]; myoblast graft success ratio is the maximal number of dystrophin positive fibers found in whole muscle sections divided by the mean of the maximal number of dystrophin positive fibers in whole muscle sections of mice treated with FK506 (positive control group).

[♠]; mouse that was not chimeric.

*; mice that were transiently chimeric.

[§]; Significantly higher ($p < 0.0001$) than LTBI group 1 and group 6 (Table 6.2).

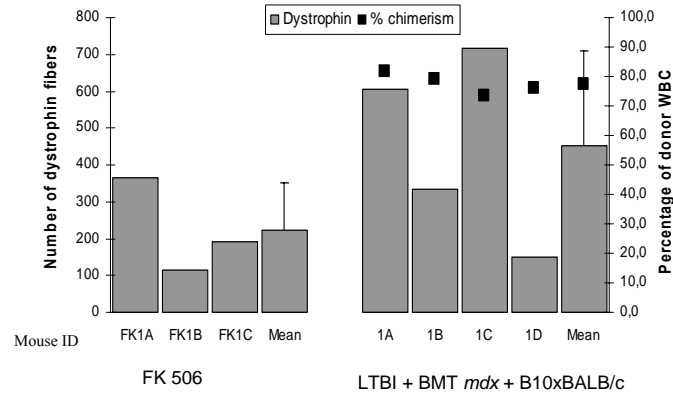
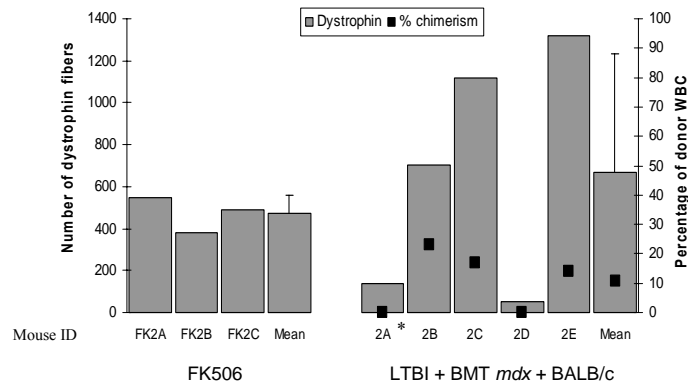
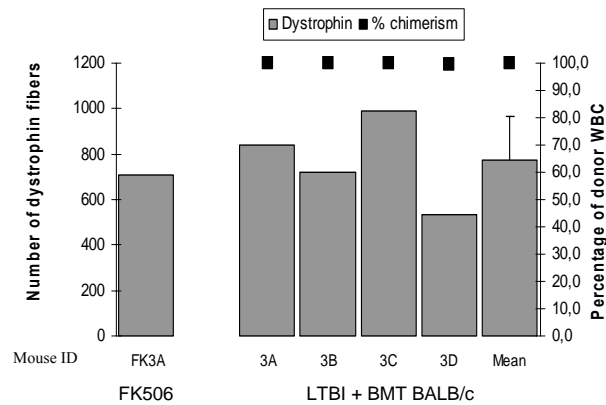
A**B****C**

Figure 6.2: Chimerism using lethal TBI led to long-term survival of myoblast transplantation. Individual myoblast transplantation (MT) results (> 110 days) represented by the number of dystrophin positive fibers found in an entire muscle section and individual percentage of donor WBC observed long-term (> 90 days). MT results are compared with FK506 treated individual mice, specific for that experiment, which serves as positive control of dystrophin expression. **A.** B10xBALB/c + *mdx* BMT and B10xBALB/c MT donor. **B.** BALB/c + *mdx* BMT and BALB/c MT donor. **C.** BALB/c BMT and BALB/c MT donor. * corresponds to transiently chimeric mice.

Low level of differentiation of bone marrow cells into muscle cells.

We assessed whether or not engrafted BM cells significantly regenerated muscle fibers. Transgenic green fluorescent GFP-B6 or non-transgenic B6 mice were used as BM donors into lethally irradiated B6 mice. To verify whether mechanical muscle damage (as in the case of MT) would increase the number of GFP-positive muscle fibers, the left TA muscles were damaged in several sites using a 27G needle 150 days after BMT. Both TA muscles of these mice were collected 180 days after BMT. We found only 0 to 3 GFP-positive muscle fibers per muscle section of the right TA in mice that received GFP-B6 BM (Figure 6.3). The same low level of GFP positive fibers (not shown) was observed in left TA muscles which had been damaged. No GFP positive fibers were observed in the negative control mice that received non-transgenic B6 BM (Figure 6.3).

Sustained mixed chimerism using anti-CD154 and anti-CD8 mAbs.

Treatment with a low dose of TBI (3 Gy) on day -1 combined with a single dose of anti-CD154 (0.5 mg; day 0) and of anti-CD8 (0.7 mg; day -1), followed by BMT of $16\text{-}18 \times 10^6$ cells from haplo-allogeneic donors (B10xBALB/c) led to stable mixed hemopoietic chimerism in 20 out of 22 mice (Figure 6.4A). Donor reconstitution at 150 days averaged $41.8 \pm 30.2\%$ for CD4+ cells, $59.4 \pm 28.9\%$ for CD8+ cells, $51.9 \pm 32.0\%$ for CD90+ cells, and $61.4 \pm 34.5\%$ for WBC. One mouse out of 22 developed only transient chimerism (4.3% at 21 days and 0.0% of WBC at 91 days) and another one was non-chimeric 21 days after BMT. Long-term chimerism was not observed in control mice receiving only TBI + BMT (Figure 6.4C; n = 5) or BMT + anti-CD8 + anti-CD154 without TBI (Figure 6.4D; n = 4). The 22 mice that received the full tolerogenic treatment were separated in 3 groups: one group received B10xBALB/c MT (n = 8), one received B10xBALB/c MT and was rechallenged with another MT from the same donor 53 days after the first one (n = 5), and one received B10xBALB/c and third-party skin transplantation (n = 9). Two mice that received MT died of unknown causes and were excluded from analysis.

However, when BM cells from fully allogeneic donors (BALB/c) were transplanted following the same tolerogenic protocol as above, chimerism was low and transient (Figure

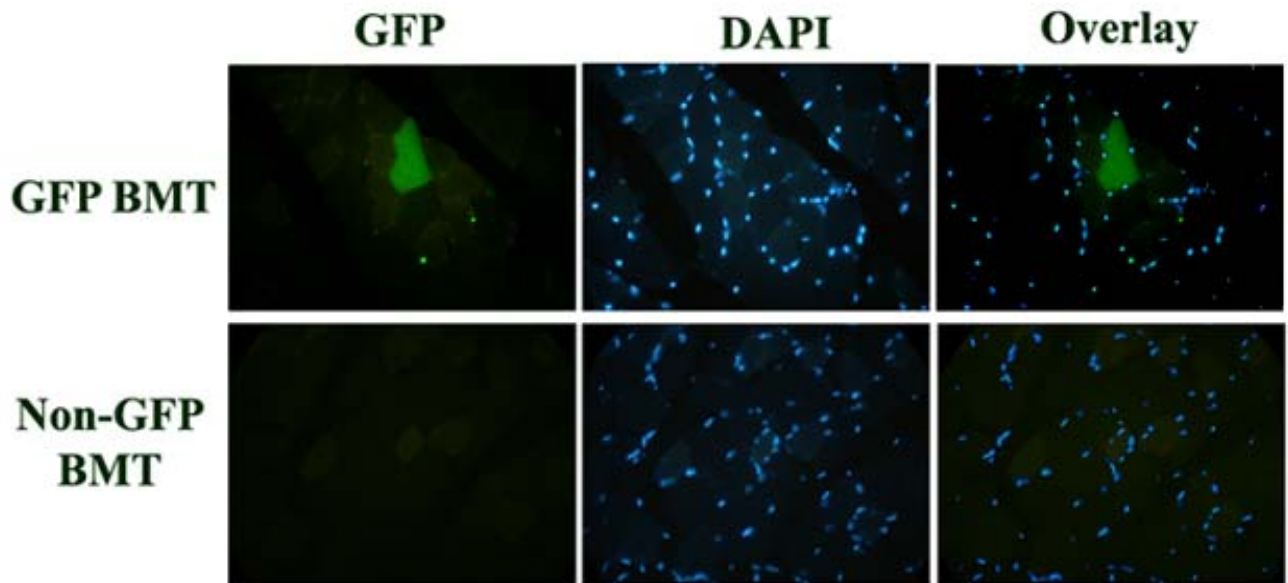


Figure 6.3: Very low rate of muscle fiber regeneration by bone marrow cells. Participation of transplanted BM cells to repair muscle fibers was assessed by transplanting either GFP-B6 or B6 BM cells into lethally irradiated B6 mice. Photomicrographs of transversal TA muscle sections of reconstituted B6 mice that received these BMT. Very few (0 to 3) GFP-expressing muscle fibers were found per muscle section in GFP-B6 BMT recipient, while no GFP positivity was observed in B6 BMT recipient. Magn = 400X.

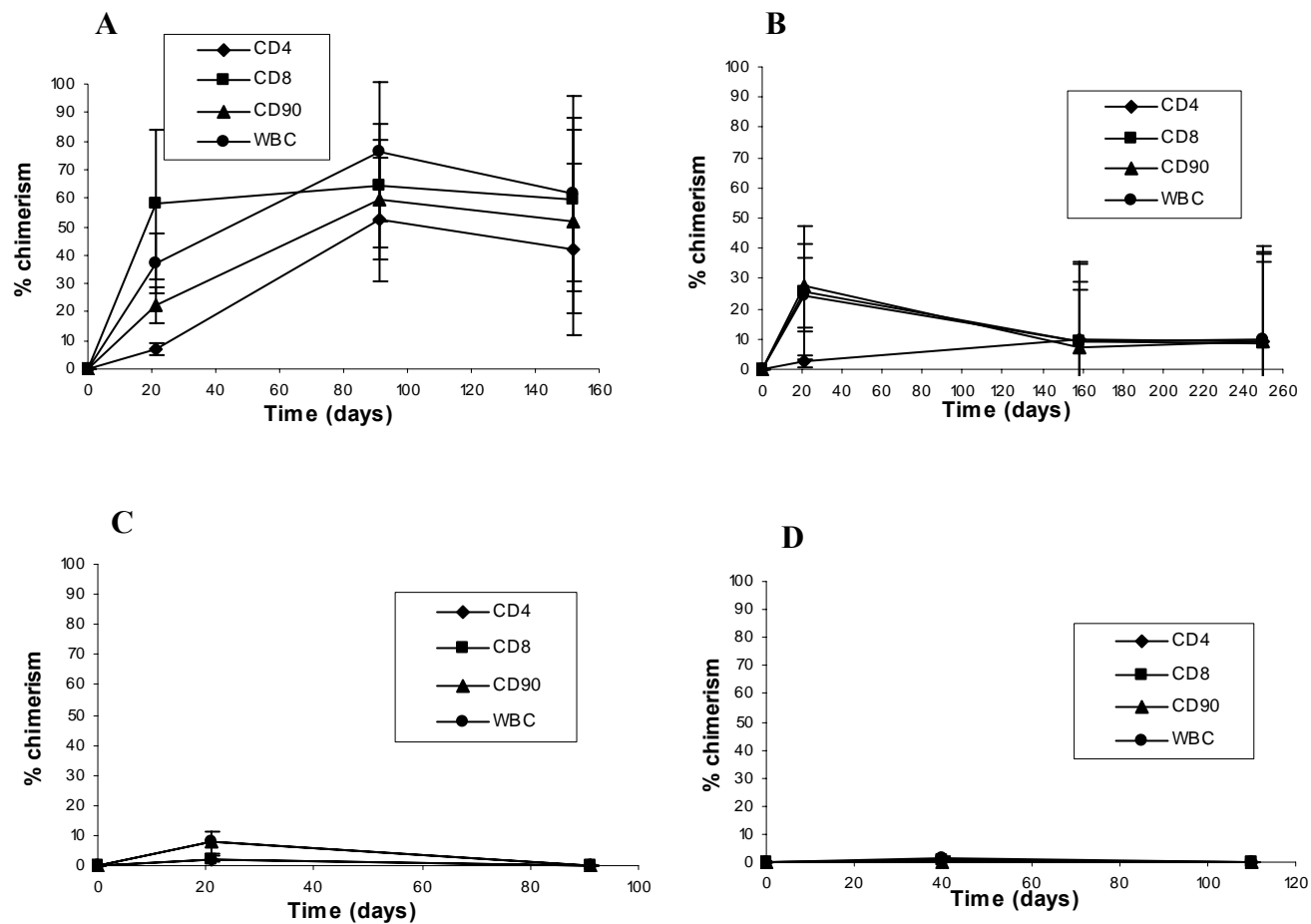


Figure 6.4: Mixed chimerism using non-myeloablative BMT, anti-CD154 and anti-CD8. Mean percentage (\pm SD) of chimerism from peripheral blood over time in mice that received a non-myeloablative protocol for BM engraftment consisting of a low dose (3 Gy) of TBI, allogeneic BMT, one dose of anti-CD154 and one dose of depleting anti-CD8. In **A**, high, reliable and stable mixed chimerism (20/22 long-term chimeric mice in major lymphoid lineages) was observed in mice receiving the non-myeloablative protocol and haplo-allogeneic BMT (B10xBALB/c into *mdx* mice). In **B**, mostly transient chimerism (13/17 transient chimeric mice and 3/17 long-term chimeric mice) was obtained using the same protocol and fully allogeneic donors (BALB/c). Long-term chimerism was not observed in control mice receiving either TBI + haplo-allogeneic BMT (n = 5; **C**) or haplo-allogeneic BMT + anti-CD8 + anti-CD154 without TBI (n = 4; **D**).

6.4B). Only 3 out of 17 mice displayed macrochimerism >150 days following BMT (i.e., respectively 91.0%, 67.0% and 2.9% of WBC), while the remaining, 13 of these 17 mice had only transient chimerism ($25.9 \pm 12.1\%$ at 21 days and only $0.6 \pm 0.3\%$ at 158 days after BMT). One mouse was non-chimeric as soon as 21 days after BMT. These 17 mice received different grafts as follow: one group received BALB/c MT (n = 6), one group received BALB/c MT and was rechallenged with another MT from the same donor 60 days after the first one (n = 6), and one group received BALB/c and third-party skin transplantation (n = 5). Two mice that received MT died of unknown causes and were excluded from analysis.

Long-term dystrophin expression in chimeras and in most transiently chimeric mice receiving WBI + BMT + anti-CD8 + anti-CD154.

All mice that received the tolerogenic protocol with haplo-allogeneic (B10xBALB/c) BMT and haplo-allogeneic MT, and that developed high levels of chimerism had high number of dystrophin positive fibers, resulting in high myoblast graft success ratios (Figure 6.5A and Table 6.1, NM experiment, group 1; n = 8). Myoblast transplantation was performed on day +1 after BMT. The mean graft success ratio of this group was 1.01, showing efficient graft survival >90 days after MT. A high graft success ratio (0.85) was also observed in the mouse in that same group that was transiently chimeric.

Among the 6 mice that received fully allogeneic (BALB/c) BMT and MT, only 2 mice had sustained chimerism and 4 mice had only transient chimerism. Myoblast transplantation was performed 50 days after BMT. Despite a low rate of BM engraftment, 3 out of these 6 mice (i.e., 2 mice with sustained chimerism and 1 mouse with transient chimerism) had a significant level of dystrophin expression (Figure 6.5B and Table 6.1, NM experiment group 2). It is noteworthy that the mouse that had transient chimerism only had a myoblast graft success ratio of 0.58 (Table 6.1, NM experiment group 2). The mean myoblast graft success ratio in this group that received fully allogeneic BMT was only 0.48, reflecting the low rate of BM engraftment.

Very low levels of dystrophin (myoblast graft success ratios between 0.00 and 0.05) were observed in control groups that received haplo-allogeneic MT and either TBI + anti-

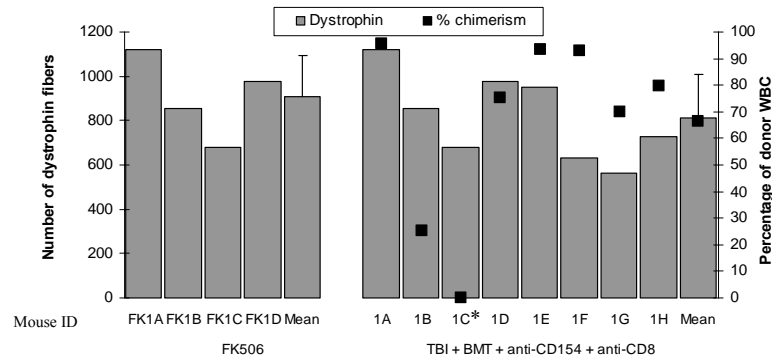
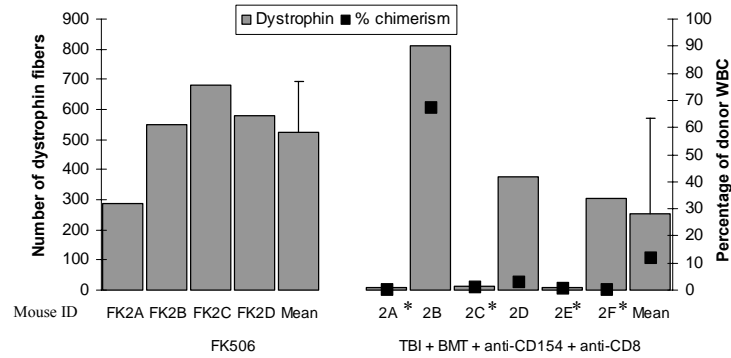
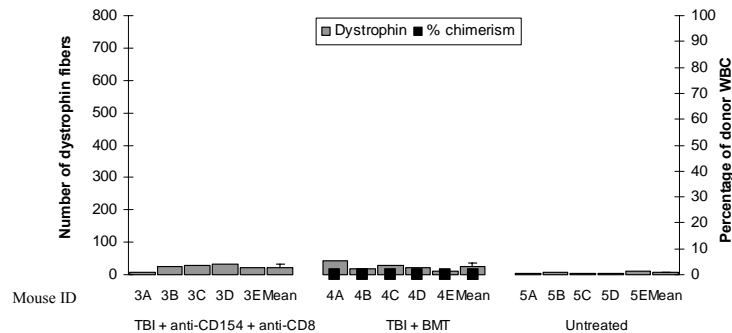
A**B****C**

Figure 6.5: Chimerism obtained using non-myeloablative conditioning led to long-term survival of donor myoblast transplants. Individual myoblast transplantation results (> 90 days) represented by the number of dystrophin positive fibers found in an entire muscle section and individual percentage of WBC chimerism observed long-term (> 90 days). Non-myeloablative protocol consisted of a low dose (3 Gy) TBI, allogeneic BMT, one dose of anti-CD154 and one dose of depleting anti-CD8. MT results are compared with FK506 treated individual mice, specific for that experiment, which serves as a positive control of dystrophin expression. **A.** Haplo-allogeneic donor: B10xBALB/c BMT and B10xBALB/c MT. **B.** Fully allogeneic donor: BALB/c BMT and BALB/c MT. **C.** Control groups receiving haplo-allogeneic transplantation and incomplete tolerogenic protocols. * corresponds to transiently chimeric mice.

CD154 + anti-CD8, TBI + BMT, or no tolerogenic treatment (Table 6.1, NM experiment, groups 3, 4, or 5 respectively).

Rechallenge with a second MT did not break tolerance

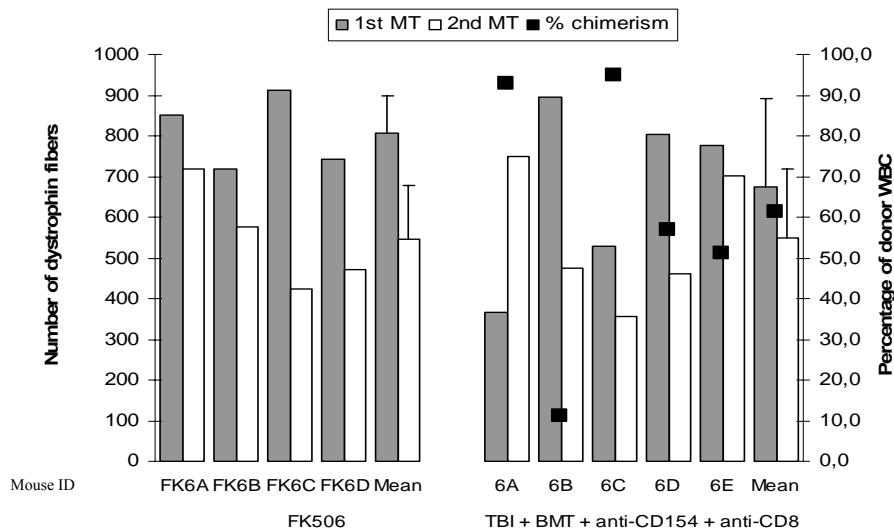
Another set of mice that received the whole treatment (TBI + BMT + anti-CD154 + anti-CD8) and haplo-allogeneic (n = 5) or fully allogeneic (n = 6) MT was rechallenged with a second MT from the same donor in the contra-lateral TA 50-60 days after the first MT. Among recipients of transplants from haplo-allogeneic donors (B10xBALB/c BMT and MT), all mice in this group developed long-term chimerism and were tolerant to both first and second MT, as observed by long-term expression of dystrophin (160 days after the first and 107 days after the second MT) in both TAs (Figure 6.6A and Table 6.2, group 6). The mean myoblast graft success ratios were respectively 0.84 and 0.99 for the first and second graft respectively.

Surprisingly, rechallenging the mice that received fully allogeneic transplants (BALB/c BMT and MT) and the same conditioning regimen as above led to similar results, despite the fact that only 1 mouse out of 6 showed long-term chimerism (Figure 6.6B and Table 6.2, group 7). The remaining mice in this group had transient chimerism (mean WBC chimerism $20.4 \pm 14.0\%$ at 21 days, $0.5 \pm 0.2\%$ at 158 days and 0.0% at 250 days after BMT). Mean myoblast graft success ratios were 0.85 and 1.01 for the first and second myoblast graft, respectively. However, one transiently chimeric mouse rejected transplanted myoblasts, as demonstrated by a very low level of dystrophin expression (mouse #7C, Figure 6.6B).

Long-term survival of allogeneic skin grafts on chimeric mice.

We also tested skin allograft survival on another group of mice that received the whole tolerogenic treatment (TBI + BMT + anti-CD154 + anti-CD8) and haplo-allogeneic (n = 9) or fully allogeneic (n = 5) skin transplantation, related to BMT donor. Skin transplantation was performed on day +2 for haplo-allogeneic and on day +6 after BMT for fully allogeneic groups. Figure 6.7A shows long-term survival of 89% (8 out of 9 mice) of haplo-allogeneic skin transplants at 100 days. The one mouse that rejected B10xBALB/c

A



B

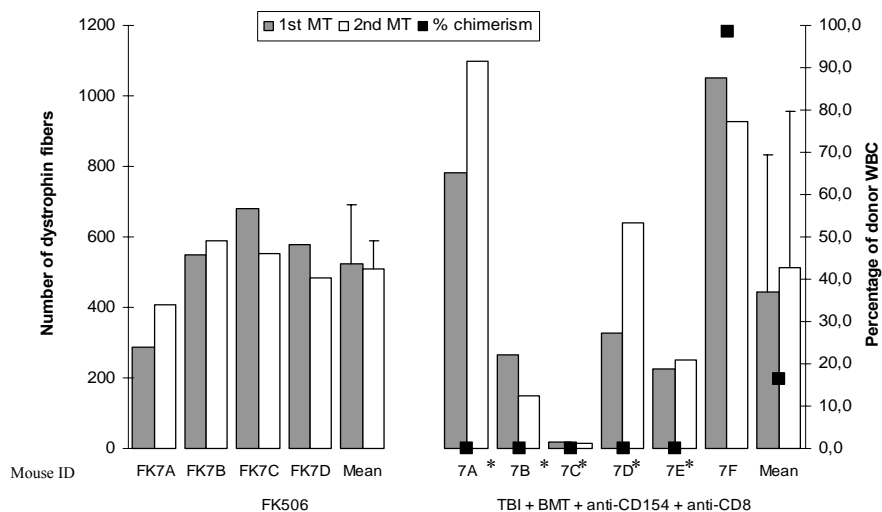


Figure 6.6: Rechallenge with a second MT demonstrates tolerance in transient and durable mixed chimeras. Individual myoblast transplantation results and individual percentage of WBC chimerism of another set of mice that received the non-myeloablative protocol and was rechallenged with a second MT from the same original donor: A) Haplo-allogeneic donor (B10xBALB/c; 160 days for the first MT and 107 days for the second); B) Fully allogeneic donor (BALB/c; 202 days for the first MT and 142 days for the second). Chimerism assessed >150 days after BMT. . MT results are compared with FK506 treated individual mice, specific for that experiment. * corresponds to transient chimeric mice.

Table 6.2. Results of rechallenge with a second myoblast transplantation.

Experiment	Groups	n	Treatments	BMT donor	Long-term chimerism (> 150 days)	MT donor	First or second MT	Time after MT (days)	Myoblast graft success ratio [¶]						Mean graft success ratio	Lymphocytic infiltration	
Non-myeloablative (NM)	6	5	TBI + BMT + anti-CD154 + anti-CD8	B10xBALB/c	5/5	B10xBALB/c	1st	160	0.45	0.66	0.96	1.00	1.11	0.84	219 ± 37	191 ± 72	
							2nd	107	1.29	0.65	1.28	0.84	0.87	0.99	183 ± 62	231 ± 73	
	7	6	TBI + BMT + anti-CD154 + anti-CD8	BALB/c	1/6	BALB/c	1st	202	0.04*	0.50*	0.43*	0.62*	1.49*	2.00	0.85	157 ± 67	150 ± 48
							2nd	142	0.03*	0.30*	0.49*	1.26*	2.16*	1.82	1.01	219 ± 145	252 ± 209

¶; Results displayed by corresponding mouse.

* ; Mice that were transiently chimeric

skin by day 19 did not develop chimerism. All mice in that group rejected third-party CD1 skin grafts by day 49 (after skin transplant).

In the fully allogeneic BMT recipients, 60% of mice retained their skin grafts 100 days after transplantation (Figure 6.7B). However, by day 126, all BALB/c skin grafts were rejected. One mouse out of the five did not develop chimerism and rejected the skin transplant by day 20. The other 4 mice were transiently chimeric (mean WBC of $24.3 \pm 3.3\%$ at 21 days, $0.6 \pm 0.1\%$ at 158 days and 0.0% at 250 days after BMT). All five mice rejected third party CD1 skin grafts by day 40.

Muscle-specific lymphocytic infiltration in tolerant mice.

Infiltration by T lymphocytes was assessed in muscles that received myoblast transplantation and in skin grafts that survived long-term. In all muscles (Lethal TBI or non-myeloablative BMT, tolerant or not, haplo- or fully allogeneic), significant lymphocytic infiltration was observed (Tables 6.1 and 6.2). However, lymphocytes were found only in small clusters (Figures 6.8A and B). Approximately 50% of these clusters were found close to muscle fibers expressing dystrophin. A significantly higher level of CD4 and CD8 infiltration was found in the muscles of group NM-1 (Table 6.1; $p < 0.0001$), which received the non-myeloablative treatment and haplo-allogeneic MT, compared to LTBI group 1 (Table 6.1) and NM-6 (Table 6.2). However, this higher infiltration was not observed in the muscles of group NM-6 (Table 6.2), which received the same treatment and which presented the same myoblast graft success. Except for group NM-1 in the non-myeloablative experiment, no significant differences were observed in the level of infiltration between the lethal TBI experiment and the non-myeloablative experiment. Rechallenging the mice with a second MT did not also affect lymphocytic infiltration.

Infiltrating cells were not observed in haplo-allogeneic skin grafts that survived long-term (Figure 6.8C).

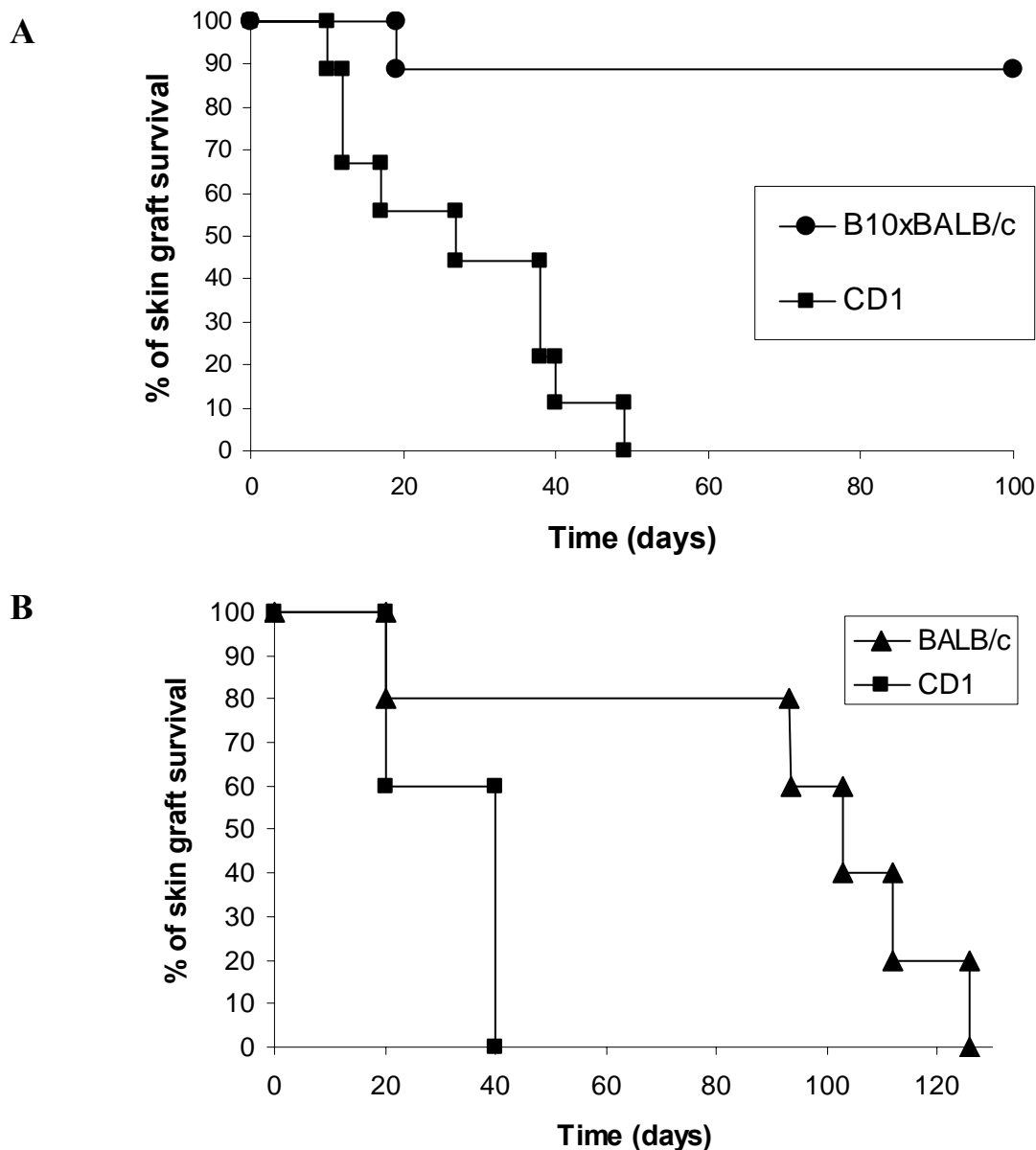


Figure 6.7: Long-term survival of donor skin grafts on chimeric mice. Skin graft survival of another group of mice that received the non-myeloablative treatment and haplo-allogeneic ($n = 9$; A) or fully allogeneic ($n = 5$; B) skin transplantation. All mice also received unrelated third-party skin grafts (CD1). Two mice in A died of unknown causes with healthy B10xBALB/c skin grafts (83 days and 90 days after skin transplant) and were censored using Kaplan-Meier estimate.

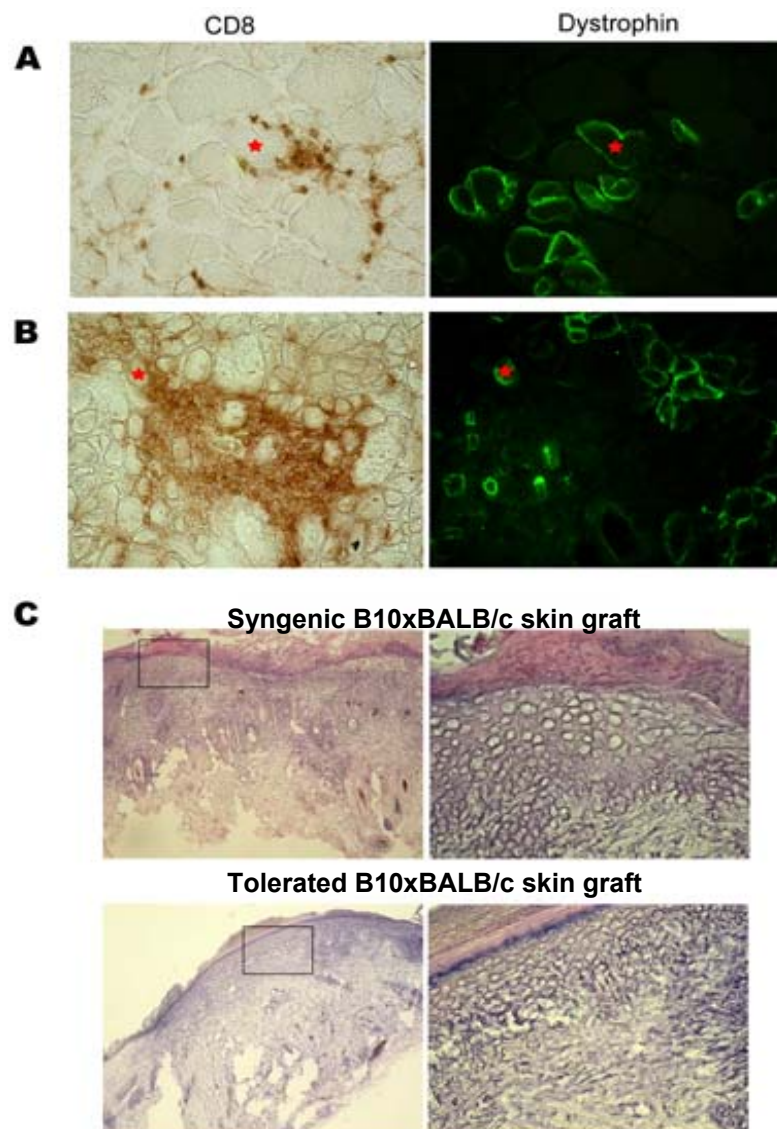


Figure 6.8: Lymphocytic infiltration in muscles injected with myoblasts, but not in long-term surviving skin grafts. Representative photomicrographs of CD8 T cell infiltration and dystrophin expression in TA muscles that received lethal TBI (LTBI), fully allogeneic BALB/c BMT and MT (A) or non-myeloablative treatment (TBI + BMT + anti-CD154 + anti-CD8) and haplo-allogeneic B10xBALB/c BMT and MT (B) (Magn. 400X). Red stars co-localize the same muscle fiber. Similar histological infiltration was observed among all mice that received MT. C) Comparison of infiltration with H/E staining of long-term surviving (>100 days) syngenic or haplo-allogeneic skin graft on mice that received non-myeloablative BMT. Higher magnification on right of the rectangle on left (Magn. 100X and 400X).

6.7 Discussion

Developing an efficient therapy for DMD patients is our major goal, and progress towards a logical and applicable clinical approach would enhance life expectancy and quality of life of these patients, for which no treatment currently exists. We describe here a novel approach to treat DMD patients that aims to induce tolerance to myogenic cell (myoblast) transplantation (MT) through mixed chimerism using a previously described non-myeloablative protocol (17) including a low dose of total body irradiation (3 Gy), BMT, one dose of anti-CD154 and one dose of anti-CD8 mAb.

Myoblast transplantation is peculiar. Indeed, after transplantation, these cells differentiate into muscle fibers and express muscle-specific antigens, which are not expressed by undifferentiated myoblasts. We thus initially wanted to determine whether chimerism induction would permit the establishment of immunological tolerance towards these antigens. Hence, MT have proved resistant to peripheral tolerance protocols that are effective in many other types of transplantation ((8) and unpublished data).

In our experiments, two different donors, haplo-allogeneic and fully allogenic, and a “stringent” (26) strain combination (BALB/c into B10) were used. In the case of future clinical application, one of the parents would be used as a donor, which would be haplo-mismatched at the MHC locus. We are unclear as to the reason for the transience of chimerism using fully mismatched BALB/c donors, since durable chimerism has been already obtained using a similar protocol in multiple fully mismatched combinations (17). Differences in the timing of irradiation type, as well as differing requirements of antibody doses in diverse strain combinations might explain this discrepancy.

Nevertheless, we obtained sustained donor myoblast survival in transient chimeras prepared with BALB/c donors. Indeed, 5/9 (56%) of transiently chimeric mice had significant long-term expression of dystrophin. Four of these mice showed clear-cut tolerance to MT, as demonstrated by long-term graft survival when rechallenged with a second MT. This observation is consistent with other report that showed that transient

chimerism induced tolerance (27). All mice that developed long-term chimerism were tolerant to donor-type MT.

Despite strong tolerance obtained here, modest clusters of infiltrating lymphocytes were observed in muscles of all chimeras, including mixed and full chimeric mice prepared with a lethal TBI-containing regimen. This infiltration did not seem to affect long-term expression of dystrophin, since a second MT survived long-term. Moreover, no infiltration was detected in long-term surviving skin grafts, showing muscle-specificity of these lymphocytes. Since dystrophin is absent in mdx mice, we hypothesize that lymphocytes that arose from BMT might not be negatively selected against dystrophin peptides in the thymus, and could cause rejection. Although RT-PCR showed dystrophin isoform expression in the thymus, protein production was not confirmed by Western Blot (28).

We also asked whether BM cells could participate in muscle regeneration, as already shown (29, 30). We used GFP-B6 mice as BM donors into lethally irradiated B6 mice. Despite survival of these mice, showing efficient BM engraftment, we observed only between 0 and 3 GFP-positive muscle fibers per muscle section, which represent less than 1% of the total number of fibers. This confirms the results obtained in other studies (31, 32). Moreover, mechanical muscle damage did not increase the number of GFP-positive muscle fibers, showing that dystrophin expression in mice that received both BMT and MT originated mainly from transplanted myogenic cells rather than from BM derived cells. Of note, in cases of positive myoblast transplantation results in all experiments described here, dystrophin expression represented at least 40% of the total number of muscle fibers.

In conclusion, we have obtained unprecedented results showing strong and donor-specific induction of tolerance to allogeneic myoblast transplantation through mixed chimerism. We believe that any applicable approach to treat DMD should be developed as soon as possible to patients. MT is a difficult treatment to administer, since every muscle of the patients would require multiple myoblast injections. Moreover, with the approach of transplanting myoblasts from a close relative, a different muscle culture would need to be established for each patient. If embryonic or muscle-derived (33) stem cells could be used to produce hematopoietic stem cells as well as myoblasts, these could both be transplanted to all DMD patients.

6.8 Acknowledgment

We would like to thank Maurice Dufour for FACS analysis.

6.9 References

1. Bonilla E, Samitt CE, Miranda AF, Hays AP, Salviati G, DiMauro S, et al. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell* 1988; 54(4): 447-452.
2. Brussee V, Merly F, Tardif F and Tremblay JP. Normal myoblast implantation in MDX mice prevents muscle damage by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 250(2): 321-327.
3. Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP and Kunkel LM. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature* 1989; 337(6203): 176-179.
4. Skuk D and Tremblay JP. Progress in myoblast transplantation: a potential treatment of dystrophies. *Microsc Res Tech* 2000; 48(3-4): 213-222.
5. Skuk D, Goulet M, Roy B and Tremblay JP. Myoblast transplantation in whole muscle of nonhuman primates. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59(3): 197-206.
6. Kinoshita I, Roy R, Dugre FJ, Gravel C, Roy B, Goulet M, et al. Myoblast transplantation in monkeys: control of immune response by FK506. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55(6): 687-697.
7. Kinoshita I, Vilquin JT, Guerette B, Asselin I, Roy R and Tremblay JP. Very efficient myoblast allotransplantation in mice under FK506 immunosuppression. *Muscle Nerve* 1994; 17(12): 1407-1415.
8. Camirand G, Caron NJ, Turgeon NA, Rossini AA and Tremblay JP. Treatment with anti-CD154 antibody and donor-specific transfusion prevents acute rejection of myoblast transplantation. *Transplantation* 2002; 73(3): 453-461.
9. Wekerle T and Sykes M. Mixed chimerism and transplantation tolerance. *Annu Rev Med* 2001; 52: 353-370.

10. Sorof JM, Koerper MA, Portale AA, Potter D, DeSantes K and Cowan M. Renal transplantation without chronic immunosuppression after T cell-depleted, HLA-mismatched bone marrow transplantation. *Transplantation* 1995; 59(11): 1633-1635.
11. Sayegh MH, Fine NA, Smith JL, Rennke HG, Milford EL and Tilney NL. Immunologic tolerance to renal allografts after bone marrow transplants from the same donors [see comments]. *Ann Intern Med* 1991; 114(11): 954-955.
12. Jacobsen N, Taaning E, Ladefoged J, Kristensen JK and Pedersen FK. Tolerance to an HLA-B,DR disparate kidney allograft after bone-marrow transplantation from same donor [letter]. *Lancet* 1994; 343(8900): 800.
13. Helg C, Chapuis B, Bolle JF, Morel P, Salomon D, Roux E, et al. Renal transplantation without immunosuppression in a host with tolerance induced by allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 1994; 58(12): 1420-1422.
14. Svendsen UG, Aggestrup S, Heilmann C, Jacobsen N, Koch C, Larsen B, et al. Transplantation of a lobe of lung from mother to child following previous transplantation with maternal bone marrow. *J Heart Lung Transplant* 1999; 18(4): 388-390.
15. Buhler LH, Spitzer TR, Sykes M, Sachs DH, Delmonico FL, Tolkoff-Rubin N, et al. Induction of kidney allograft tolerance after transient lymphohematopoietic chimerism in patients with multiple myeloma and end-stage renal disease. *Transplantation* 2002; 74(10): 1405-1409.
16. Spitzer TR, Delmonico F, Tolkoff-Rubin N, McAfee S, Sackstein R, Saidman S, et al. Combined histocompatibility leukocyte antigen-matched donor bone marrow and renal transplantation for multiple myeloma with end stage renal disease: the induction of allograft tolerance through mixed lymphohematopoietic chimerism. *Transplantation* 1999; 68(4): 480-484.
17. Ito H, Kurtz J, Shaffer J and Sykes M. CD4 T cell-mediated alloresistance to fully MHC-mismatched allogeneic bone marrow engraftment is dependent on CD40-

- CD40 ligand interactions, and lasting T cell tolerance is induced by bone marrow transplantation with initial blockade of this pathway. *J Immunol* 2001; 166(5): 2970-2981.
18. Wekerle T, Sayegh MH, Hill J, Zhao Y, Chandraker A, Swenson KG, et al. Extrathymic T cell deletion and allogeneic stem cell engraftment induced with costimulatory blockade is followed by central T cell tolerance. *J Exp Med* 1998; 187(12): 2037-2044.
 19. Durham MM, Bingaman AW, Adams AB, Ha J, Waitze SY, Pearson TC, et al. Cutting edge: administration of anti-CD40 ligand and donor bone marrow leads to hemopoietic chimerism and donor-specific tolerance without cytoreductive conditioning. *J Immunol* 2000; 165(1): 1-4.
 20. Wekerle T, Kurtz J, Ito H, Ronquillo JV, Dong V, Zhao G, et al. Allogeneic bone marrow transplantation with co-stimulatory blockade induces macrochimerism and tolerance without cytoreductive host treatment. *Nat Med* 2000; 6(4): 464-469.
 21. Emerson SG. Ex vivo expansion of hematopoietic precursors, progenitors, and stem cells: the next generation of cellular therapeutics. *Blood* 1996; 87(8): 3082-3088.
 22. Cossu G, Zani B, Coletta M, Bouche M, Pacifici M and Molinaro M. In vitro differentiation of satellite cells isolated from normal and dystrophic mammalian muscles. A comparison with embryonic myogenic cells. *Cell Differ* 1980; 9(6): 357-368.
 23. Wakeford S, Watt DJ and Partridge TA. X-irradiation improves mdx mouse muscle as a model of myofiber loss in DMD. *Muscle Nerve* 1991; 14(1): 42-50.
 24. Harris JB, Johnson MA and Karlsson E. Proceedings: Histological and histochemical aspects of the effect of notexin on rat skeletal muscle. *Br J Pharmacol* 1974; 52(1): 152P.
 25. Unkeless JC. Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J Exp Med* 1979; 150(3): 580-596.

26. Williams MA, Trambley J, Ha J, Adams AB, Durham MM, Rees P, et al. Genetic characterization of strain differences in the ability to mediate CD40/CD28-independent rejection of skin allografts. *J Immunol* 2000; 165(12): 6849-6857.
27. Monaco AP. Chimerism in organ transplantation: conflicting experiments and clinical observations. *Transplantation* 2003; 75(9 Suppl): 13S-16S.
28. Tokarz SA, Duncan NM, Rash SM, Sadeghi A, Dewan AK and Pillers DA. Redefinition of dystrophin isoform distribution in mouse tissue by RT-PCR implies role in nonmuscle manifestations of duchenne muscular dystrophy. *Mol Genet Metab* 1998; 65(4): 272-281.
29. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279(5356): 1528-1530.
30. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; 401(6751): 390-394.
31. LaBarge MA and Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 2002; 111(4): 589-601.
32. Gussoni E, Bennett RR, Muskiewicz KR, Meyerrose T, Nolte JA, Gilgoff I, et al. Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 2002; 110(6): 807-814.
33. Cao B, Zheng B, Jankowski RJ, Kimura S, Ikezawa M, Deasy B, et al. Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential. *Nat Cell Biol* 2003; 5(7): 640-646.

6.10 Tables and Figures

Chapitre 7. Nouveau traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne par l'induction de tolérance immunologique utilisant l'anti-CD45RB, l'anti-CD154 et le chimérisme mixte

Ce chapitre présente le troisième de trois articles scientifiques de cette thèse détaillant les résultats de transplantation de myoblastes obtenus en développant un chimérisme mixte à l'aide d'un protocole non-myeloablatif incluant, entre autres, l'anti-CD45RB. Les auteurs secondaires, Joël Rousseau et Marie-Ève Ducharme, ont apporté un excellent support technique pour l'exécution des greffes effectuées pour ce manuscrit. Cet article a été soumis pour publication à la revue *The American Journal of Transplantation*, février 2004.

7.1 Résumé

Le présent article démontre l'efficacité d'un nouveau protocole non-myéloablatif d'induction de tolérance par chimérisme mixte, utilisant les anticorps anti-CD154 et anti-CD45RB, ainsi qu'une faible dose d'irradiation pancorporelle (3 Gy). Ce protocole offre l'avantage de n'utiliser aucun anticorps déplétant non-spécifiquement les lymphocytes T. L'utilisation de l'anti-CD45RB a été démontrée efficace comme immunomodulateur puissant, permettant la survie à long terme de différents types de greffe par tolérance périphérique, mais n'avait jamais été testé pour la prise de greffe de moelle osseuse. Ce traitement a uniformément induit un niveau élevé de chimérisme mixte, la survie à long terme des myoblastes transplantés (> 100 jours) et la déletion des clones lymphoïdes alloréactifs. En plus, les souris chimériques ont démontré une tolérance envers une deuxième greffe de myoblastes ou de peaux du même donneur. Par contre, les souris ne recevant que l'anti-CD154 ou l'anti-CD45RB, n'ont pas développé de chimérisme et de tolérance envers la transplantation de myoblastes, sauf chez une souris recevant l'anti-CD154 seul. Ainsi, la combinaison des anticorps anti-CD154 et anti-CD45RB est synergique et favorise l'induction de chimérisme stable et l'induction de tolérance à des greffes allogéniques de myoblastes, sans aucune immunosuppression soutenue.

7.2 Titre: Novel Duchenne Muscular Dystrophy Treatment Through Myoblast Transplantation Tolerance Using anti-CD45RB, anti-CD154 and mixed chimerism¹

Geoffrey Camirand*, Joël Rousseau*, Marie-Ève Ducharme*, David M. Rothstein^{†,3} and Jacques P. Tremblay*^{2,3}

* Unité de recherche en génétique humaine, Centre de recherche du CHUL, Université Laval, 2705 blvd Laurier, RC-9300, Québec, Canada, G1V 4G2. Tel: 418-654-2186. Fax: 418-654-2207.

† Dept Internal Medicine/Nephrology, Yale Medical School, CAB S 511, PO Box 208029, New Haven, CT 06520-8029, USA. Tel: 203-785-6738. Fax: 203-737-1801.

Running title: Myoblast transplant tolerance with anti-CD45RB and anti-CD154

Keywords: Tolerance, transplantation, costimulation, hematopoiesis, rodent.

7.3 Footnotes

1- This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM), the Muscular Dystrophy Association of Canada (MDAC) and the Canadian institutes of health research (CIHR). This work was also supported in part by the National Institutes of Health (D.M.R.).

2- Address correspondence to : Jacques P. Tremblay, Ph.D., Université Laval, Unité de Génétique humaine, Centre Hospitalier de l'Université Laval, 2705 boul. Laurier, RC-9300, Ste-Foy (Qc) Canada G1V 4G2, fax: 418-654-2207, tel: 418-654-2186, tel: 418-656-4141 ext. 7307, Jacques-P.Tremblay@crchul.ulaval.ca

3- Both authors contributed equally to this manuscript.

4- Abbreviation used: DMD: Duchenne muscular dystrophy; DST: donor-specific transfusion; MT: myoblast transplantation; BMT: bone marrow transplantation; GVHD: graft versus host disease; TA: *Tibialis anterior*; WBI: whole body irradiation; HA: haplo-allogeneic; FA: fully allogeneic.

7.4 Abstract

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a fatal disease caused by a defect in the skeletal muscle protein, dystrophin. One potential therapy for DMD involves transplantation of myoblasts from normal individuals. The induction of immunological tolerance promises to prevent rejection while decreasing toxicity from chronic immunosuppression. Unfortunately, myoblast allografts are particularly immunogenic and transplant tolerance into dystrophic (*mdx/mdx*) mice has not yet been achieved. Here, we induced “central tolerance” using a novel non-myeloablative conditioning regimen consisting of anti-CD45RB, anti-CD154 and low dose (3 Gy) whole body irradiation followed by either haplo- or fully allogeneic bone marrow. This regimen uniformly induced long-lived high-level mixed chimerism, long term (>100 days) engraftment of allogeneic myoblasts and deletion of donor-reactive cells. Moreover, all recipients exhibited tolerance to second myoblast allografts or donor-specific tolerance to skin transplants performed >80 days after the initial graft. In contrast, mice conditioned with irradiation and either anti-CD45RB or anti-CD154, with one exception, lacked chimerism, long-term survival of primary myoblast transplants, or tolerance. Thus, these mAbs synergize to promote stable chimerism and allow long-term survival of myoblast allografts without sustained immunosuppression for the first time. This novel protocol could be applied to future clinical trials in myoblast transplantation for treatment of DMD and for transplantation of any type of cells and organs.

7.5 Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD)⁴ is a uniformly fatal disease caused by X-linked inheritance of a defect in the dystrophin gene. Dystrophin is a structural protein important for maintenance of muscle integrity. Muscle fibers are cellular syncytia resulting from the fusion of hundreds of myoblasts. Muscle fibers damaged during normal activity are repaired by proliferation and fusion of peripheral stem cells with existing fibers. These peripheral stem cells are known as satellite cells, or myoblasts when proliferating. Unfortunately, in the case of DMD, the repaired muscle fibers still lack dystrophin leading to extremely high muscle fiber turnover early-on. However, within several years, progressive fibrosis and muscle weakness begin due to exhaustion of proliferative capacity of myoblasts, leading to death in young adulthood (1). Restoration of functional dystrophin in DMD could be achieved by transplanting myoblasts containing the normal dystrophin gene. This has been demonstrated in mdx mice which lack normal dystrophin and serves as a model for DMD (2). After injection into muscle tissue, syngenic myoblasts fuse with themselves or with existing muscle fibers of the host, thereby introducing normal dystrophin gene. However, in the clinical situation, allogeneic myoblasts carrying wild type dystrophin are required. Like other types of allografts, allogeneic myoblasts are rapidly rejected by mdx mice unless sustained immunosuppression is administered (3-5).

Despite improvements in immunosuppression, only immunological tolerance promises to improve engraftment while reducing untoward side effects of chronic immunosuppression, especially in young and debilitated patients. In this regard, costimulatory blockade with anti-CD154, particularly when combined with Donor-Specific Transfusion (DST), can induce peripheral tolerance in several allograft models (6-8). In addition, targeting the higher Mr isoforms of the CD45 protein tyrosine phosphatase with anti-CD45RB can induce tolerance to renal and islet allografts (9, 10). Moreover anti-CD45RB is synergistic with anti-CD40L, significantly prolonging skin allograft survival in immunogenic strain combinations (11). Unfortunately, myoblast allografts have proved resistant to peripheral tolerance induction. For example, potent strategies noted above (7-11), including anti-CD154 plus DST, anti-CD45RB, or anti-CD45RB plus anti-CD154, only

modestly prolong survival of allogeneic myoblast transplants in mdx/mdx mice ((12) and manuscript in preparation).

Given suboptimal results using peripheral strategies in myoblast transplantation (MT), we turned our attention towards central tolerance. The induction of central tolerance has proved to be very robust in stringent allograft and xenograft models (13). The development of lymphoid mixed chimerism after bone marrow transplantation (BMT) leads to thymic selection of lymphocytes specifically lacking reactivity towards either the donor or host. This results in durable tolerance and limited graft versus host disease (GVHD) (14). Engraftment of donor bone marrow in mice requires administration of a conditioning regimen to prevent acute rejection by the host's mature peripheral lymphocytes and to create "space" in the recipient's bone marrow. Important progress has been made towards reducing the toxicity of conditioning regimens required for development of mixed chimerism after BMT. For example, partially myeloablative protocols combined with co-stimulatory blockade can lead to stable macrochimerism with minimal toxicity and tolerance to skin allografts in murine hosts (15, 16).

Given the potency of central tolerance, we now address whether the induction of mixed chimerism can induce long-term survival and tolerance after myoblast transplantation. Based on the synergy between anti-CD45RB and anti-CD40L in peripheral tolerance models noted above, we examined this same combination as part of a non-myeloablative conditioning regimen to promote acceptance of donor bone marrow, mixed chimerism, and central tolerance. Along with BMT, anti-CD45RB and anti-CD154, mice received low dose irradiation. Using this novel regimen, a high level of chimerism was obtained in all treated mice. Moreover, this regimen induced tolerance to allogeneic myoblast transplantation, with widespread distribution of dystrophin through treated muscles not previously attained without sustained immunosuppression. This protocol was robust, in that all recipients were tolerant either to skin or second myoblast transplants without further therapy. In marked contrast, mice treated with BMT, irradiation and either anti-CD45RB or anti-CD154 mAbs alone, with one exception, lacked long-term chimerism, long-term survival of primary myoblast transplants, or tolerance. Thus, we now

demonstrate for the first time that the combination of anti-CD45RB and anti-CD40L synergize in the induction of mixed chimerism and uniformly allow tolerance to MT.

7.6 Methods

Animals

BALB/c mice (Jackson Laboratory; H-2^d) or the first generation of a cross between BALB/c and C57BL/10J mice (BALB/10J; H-2^{bd}) were used as fully allogeneic and haploidentical (haplo-allogeneic) donors, respectively. C57BL/10J mdx/mdx (H-2^b) mice, which lack dystrophin expression, were used as recipients. All animals were housed in sterile micro-isolators with free access to food and water. All experiments were conducted in accordance the Laboratory Animal Care and Use Ethics Committee of Laval University.

Antibodies

For in vivo use, the anti-CD45RB mAb, MB23G2 (ATCC; American Type Culture Collection Rockville, MD) was purified on protein G columns according to the manufacturer's instructions (Pharmacia, Piscataway, NJ) and anti-CD154 (MR1) was from Bio Express (West Lebanon, NH). For in vitro analysis: anti-dystrophin Ab was produced in our laboratory (see below). Goat anti-rabbit IgG conjugated with Alexa 488 was from Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA). Rat anti-CD4 antibody (clone GK 1.5) was obtained from the ATCC and rat anti-CD8 antibody (clone YTS 169) was a kind gift from Dr. H. Waldmann (Oxford University, Oxford, UK). Biotin-conjugated anti-rat Ig, peroxidase and FITC -conjugated streptavidin were from Dako (Mississauga, Ontario, Canada). Anti-H2Dd-FITC, anti-H2b-Biotin, anti-CD8-Cy-chrome, anti-CD4-Cy-chrome and anti-CD16/CD32 were from BD Biosciences (Mississauga, Ontario, Canada). Anti-CD90-PE and all isotype matched controls were from Caltag (San Francisco, CA). Anti-V β 11 and anti-V β 8.1/2 PE-conjugates were from Cedarlane (Hornby, Ontario, Canada).

Production of anti-dystrophin antisera

A peptide containing 10 amino acids of the C-terminal region of dystrophin (PGKPMREDTM) plus a C-terminal cysteine was synthesized (Service de Synthèse de Peptides de l'Est du Québec, Québec, Canada). Purity was assessed by HPLC. Keyhole limpet hemocyanine was coupled to the Cysteine residue according to the manufacturer's

instructions (Pierce, Rockford, IL). New Zealand white rabbits were injected subcutaneously with 200 µg of peptide in Freund's complete adjuvant followed by 4 booster doses (in Freund's incomplete adjuvant). Sera were collected and titers determined by ELISA against the synthesized dystrophin peptide. Specificity was assessed by staining muscle sections from mdx and normal mice.

Bone marrow transplantation (BMT)

Recipient mdx mice received (3 Gy) whole body irradiation on day -1. Bone marrow cells were harvested on day 0 from BALB/c or BALB/10J mice. Briefly, donor bone marrow was flushed out of posterior limb bones with Hank's balanced salt solution (HBSS; Gibco, Burlington, Ontario, Canada), and after washing, 2×10^7 bone marrow cells were injected into the caudal vein of recipient mice.

Mouse myoblast culture

Newborn BALB/c (H-2^d) or BALB/10J (H-2^{bd}) donors were used for primary myoblast cultures as previously described (17). Briefly, muscles from arms and legs were dissociated at 37°C with collagenase (600 IU/ml; Sigma) and dispase II (2 mg/ml; Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada) for 1 hr in HBSS. The cell suspension was grown in DMEM (Gibco) supplemented with 15% fetal calf serum (FCS; Gibco) penicillin G (10 000 IU/ml; Gibco) and streptomycin (10 mg/ml; Gibco). After two days in culture, cells were harvested and frozen in DMEM, 50% FCS and 10% dimethyl sulfoxide until transplantation.

Myoblast transplantation (MT) and skin transplantation

Left hind legs of mdx recipients (2-4 months of age) were irradiated (15 Gy) 21 days prior to BMT to inhibit host myoblast proliferation and thus reduce competition with grafted myoblasts, as described (18). Prior to injection, myoblasts were resuspended in notexin venom (5 µg/ml) to induce muscle fiber necrosis without affecting the blood vessels and nerve endings (19). The Tibialis anterior (TA) was surgically exposed and 2×10^6 myoblast cells were injected in several sites to distribute them throughout the entire muscle. In each

experiment, a positive control group for MT received FK506 (Fujisawa Pharmaceutical Co., Osaka, Japan) intra-muscularly at 2.5 mg/kg/d from day 0 until the day of sacrifice.

Full thickness tail skin ~1 cm square from BALB/c and third party (CD1; outbred mice) mice were grafted on the dorsal thoracic wall, sutured with 5-0 silk and bandaged for one week. Daily visual inspections were performed for two weeks and weekly afterward. Skin grafts were considered rejected when less than 10% of the graft remained viable.

Treatment Regimens

Haplo-Allogeneic transplants (BALB/10J BMT and MT donors): Groups: HA-1, MT and no other treatment; HA-2, MT and daily FK506 (2,5 mg/Kg/day); HA-3 and HA-4, MT 30 days after whole body irradiation (WBI; 3 Gy), BMT, anti-CD45RB (100 µg; i.v) and anti-CD154 (250 µg; i.p.) on days -1, 0, 1 and 5. Group HA-4 also received a second MT from the same donor in the contralateral TA muscle 95 days after MT without further treatment. (See Table 7.1).

Fully Allogeneic transplants (BALB/c BMT and MT donors): Groups: FA-1, MT and no other treatment; FA-2, MT and daily FK506 (2,5 mg/Kg/day); FA-3, MT 30 days after WBI, BMT and anti-CD45RB (100 µg; i.v.); FA-4, MT WBI, BMT and anti-CD154 (250 µg; i.p.); FA-5, MT WBI, BMT, anti-CD45RB and anti-CD154 (dosed as above). All mAbs administered on days -1, 0, 1 and 5 (See Table 7.1).

Immunohistochemistry

Mice were sacrificed, and the TAs previously injected with myoblasts were frozen and serially sectioned at 12 µm (Microm, Walldorf, Germany) as described (20). Sections were then incubated with rabbit anti-dystrophin followed by anti-rabbit IgG-conjugated with Alexa 488. Results were quantitated as follows: serial muscle sections for each mouse were analyzed and the maximum number of dystrophin positive fibers observed in an entire single cross-section of TA muscle, was used, as described (12). Analysis of the entire cross-section, rather than a defined area, eliminates potential differences due drop-out or fibrosis. To control for any variability between experiments, each experiment includes a positive control group that was treated with daily FK506 and analyzed 30 days after MT. The ratio

of myoblast engraftment was assessed by counting the maximum number of dystrophin positive muscle fibers in a muscle cross-section from each mouse in an experimental treatment group divided by the mean maximum number of dystrophin positive muscle fibers per muscle section of all positive control mice (treated with daily FK506 and evaluated 30 days post transplantation).

Lymphocyte infiltration was evaluated as described previously (12). Briefly, muscle sections were incubated with a rat anti-CD4 or anti-CD8 antibody followed by biotin-conjugated anti-rat Ig, streptavidin-peroxidase, and DAB. Lymphocyte infiltration was quantitated by counting the total maximum number of stained cells in an entire muscle section.

Other lymphocyte markers were detected with double fluorescent labeling. Muscle sections were fixed in acetone and blocked with anti-CD16/CD32 before incubation with either anti-H2d-FITC or anti-H2b-Biotin. H2b was developed with streptavidin-FITC. CD4 or CD8 were then detected Cy3 -conjugated streptavidin.

Flow cytometry

Evaluation of chimerism was made by flow cytometric analysis of peripheral blood as described (21). In brief, forward angle and 90° light scatter were used to distinguish lymphocytes, monocytes and granulocytes in peripheral blood leukocytes. Cells were stained with anti-H-2D^d-FITC to detect cells of donor origin along with anti-CD90-PE and anti-CD8-Cy-chrome or anti-CD4-Cy-chrome. Non-specific FcR binding was blocked by anti-mouse CD16/CD32 prior to staining. Isotype matched controls were used in each analysis. The percentage of donor cells was calculated by subtracting control staining from quadrants containing donor and host cells expressing a particular lineage marker, and by dividing the percentage of donor cells by the total percentage of donor plus host cells for that lineage.

For V β T cell receptor expression analysis, peripheral blood lymphocytes were stained with anti-V β 11 or anti-V β 8.1/2 PE-conjugated mAbs, and anti-CD4-Cy-chrome mAb. Two-color flow cytometry analysis was performed on gated CD4⁺ T cells.

Statistical analysis

Kaplan-Meier statistical analysis was used for skin survival curves. Fisher PLSD test was used for statistical analysis using the Stat View software (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) and p values < 0.01 were considered statistically significant.

7.7 Results

Sustained high level mixed chimerism using non-myeloablative irradiation (3 Gy) plus anti-CD45RB and anti-CD154.

Unlike the situation where BMT is being used for treatment of leukemia, in organ or cell transplantation, only partial ablation of the host lymphoid system to produce mixed lympho-hematopoietic chimerism is needed. Using a conditioning regimen comprised of low dose WBI of 3 Gy (day -1), anti-CD45RB and anti-CD154 (on days -1, 0, 1 and 5), 2 X 10⁷ haplo-allogeneic (BALB/10J) or fully allogeneic (BALB/c) donor bone marrow cells were transferred into mdx/mdx recipients (day 0). In the case of haplo-allogeneic (“HA”) bone marrow transplantation, very high levels of chimerism were achieved in all recipients, reaching 90% of total white blood cells 250 days after BMT (Figure 7.1A). Using fully allogeneic (“FA”) BMT, high levels of chimerism were again achieved in all recipients, with 60% of the total white blood cells being of donor origin 215 days after BMT (Figure 7.1B). In both situations, all recipients developed multilineage chimerism, as determined by three-color flow cytometry using cell-specific markers for CD4, CD8, and CD90. Control groups received fully allogeneic BMT with WBI (3 Gy) + BMT and either anti-CD45RB alone (group FA-3) or anti-CD154 alone (group FA-4; see Table 7.1). Figure 7.1C shows clear-cut synergism between anti-CD154 and anti-CD45RB in their ability to induce mixed chimerism 20 and 160 days after fully allogeneic BMT. None of these control animals demonstrated long-term hemopoietic chimerism after 20 days, except for one of four mice in group FA-4 (WBI + BMT + anti-CD154) which reached >80% chimerism 160 days after BMT (mouse 4c, Figure 7.1C). A second mouse (mouse 4d) in that same control group developed low level transient chimerism (4.8% at 20 days and 0% at 160 days after BMT).

Stable mixed chimerism leads to long-term survival of haplo- and fully allogeneic myoblast transplantation.

To date, tolerance to myoblast transplantation (MT) has not been demonstrated. Since MT is currently the most promising therapeutic approach for DMD, development of a

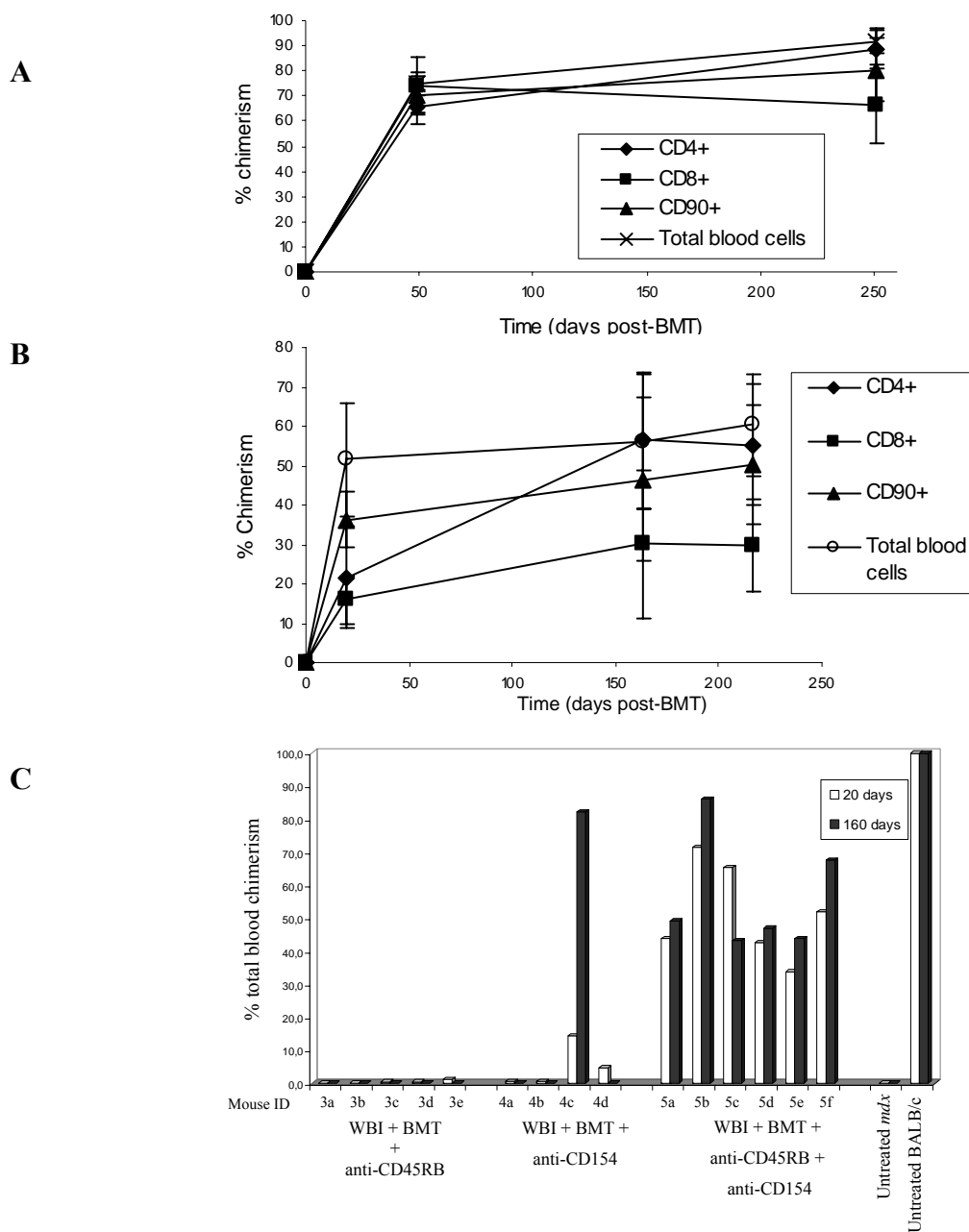


Figure 7.1. High levels of lymphoid chimerism observed in peripheral blood after BMT in mice treated with low dose of irradiation plus anti-CD154 and anti-CD45RB mAbs. Levels of chimerism in peripheral blood were evaluated in: **A.** Haplo-compatible BMT recipients after WBI (3 Gy) + anti-CD154 + anti-CD45RB mAbs evaluated at 50 and 250 days (n = 5). **B.** Fully allogeneic BMT recipients after WBI (3 Gy) + anti-CD154 + anti-CD45RB mAbs evaluated 20, 160 and 220 days after BMT (n = 6). **C.** Efficacy of individual versus combined anti-CD154 and anti-CD45RB mAbs treatments on engraftment of fully allogeneic bone marrow on day 20 and 160 (n = 4-6 for each group; corresponding to groups FA-3, 4, 5; Table 7.1).

protocol that could induce long-term survival of allogeneic myoblasts, without sustained immunosuppression, is a priority. In the case of future therapy, donor myoblasts will most likely be obtained from a parent (who differs from the patient at one entire HLA locus or haplotype). Therefore, myoblast survival was initially investigated using haplo-allogeneic donors.

Mdx mice received various conditioning regimens plus BMT as described above, followed by MT 30 days later. Shortly after injection into dystrophic muscles, normal myoblasts fuse with the host muscle fibers or with one another to form dystrophin expressing muscle fibers. To assess MT survival and fusion, the injected muscles were harvested at various time points, and dystrophin expression was determined by immunohistology. (Of note myoblasts do not express dystrophin before their fusion with muscle fibers). Figure 7.2 shows typical immunohistological staining for dystrophin. Rare (about 1%) dystrophin positive fibers (also called revertant fibers) are present in the muscles of native mdx mice, and have been shown to be the result of sporadic somatic gene mutation resulting in the skipping of the mutated exon containing a stop codon (22). Similarly low frequency (1%) revertant fibers were observed in the muscles of mdx mice that were injected with haplo-allogeneic myoblasts but were otherwise untreated. However, when mice receiving haplo or allogeneic MT were treated with chronic FK506 therapy, large numbers (40-50%) of dystrophin positive fibers were observed. This shows that high-level engraftment of myoblasts does occur when immunological rejection is prevented, and serves as a positive control for tolerance studies. Importantly, mice receiving BMT following WBI + anti-CD45RB + anti-CD154, which supported high levels of mixed chimerism (see Figure 7.1), attained significant long-term myoblast engraftment, as evidenced by high levels of dystrophin expression 100 days after transplantation (Figure 7.2). The number of muscle fibers expressing dystrophin in that group was similar to that seen after chronic FK506 administration.

Next, we directly quantified dystrophin expression in all mice receiving MT after BMT and compared this to positive control mice receiving MT plus continuous therapy with FK506 (Figure 7.3 and Table 7.1). Each mouse receiving MT after WBI + BMT + anti-CD154 + anti-CD45RB displayed as many or more dystrophin positive fibers than their

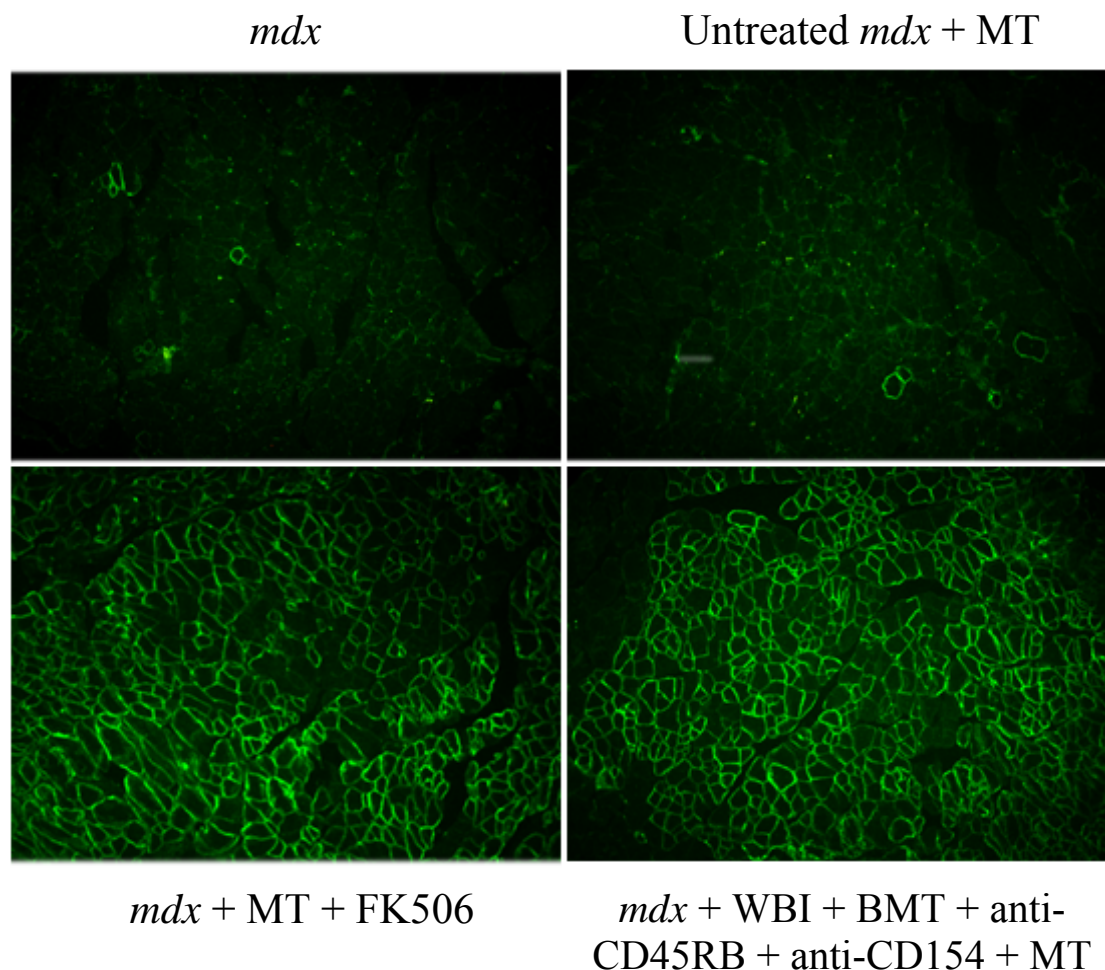


Figure 7.2. Representative dystrophin expression in TA muscle sections from mdx mice in various treatment groups: Dystrophin expression in TA muscle sections as detected by immunohistochemistry using anti-dystrophin anti-sera (magnification: 100X). Upper left: native mdx mouse (not injected with myoblasts). Upper right: mdx mouse 100 days after myoblast injection without immunosuppressive treatment. Lower left: mdx mouse chronically immunosuppressed with FK506, shown 30 days after myoblast injection. Lower right: mdx mouse treated with WBI + BMT + anti-CD45RB + anti-CD154, shown 100 days after myoblast injection.

Table 7.1. Myoblast transplantation and histology results in each treatment group:

Experiments	Group	n	Treatment ^A	Time after MT (days)	MT success ratio ^B	Mean MT success ratio	Lymphocytic infiltration	
							CD4	CD8
Haplo-allogeneic (HA)	1	5	Untreated	103	<0.01 (3), 0.01 (2)	<0.01	ND	ND
	2.1	5	FK506	30	0.71, 0.77, 0.96, 1.07, 1.46	1.00	212 ± 140	206 ± 119
	3	5	WBI + BMT + anti-CD45RB +anti-CD154	103	1.03, 1.36, 1.45, 1.55, 1.69	1.42	187 ± 60	115 ± 44
	4	5	WBI + BMT + anti-CD45RB +anti-CD154	173 ^C	0.92, 0.94, 0.99 (2), 1.11	0.99	223 ± 47	282 ± 87 ^D
Fully allogeneic (FA)	1	5	Untreated	187	0.01 (2), 0.02, 0.03, 0.04	0.02	ND	ND
	2	5	FK506	30	0.81, 0.96, 1.02, 1.09, 1.12	1.00	35 ± 19	33 ± 15
	3	5	WBI + BMT + anti-CD45RB	187	0.01 (2), 0.02 (2), 0.04	0.02	40 ± 14	60 ± 21
	4	4	WBI + BMT + anti-CD154	187	0.04, 0.05, 0.45, 0.98	0.38	191 ± 137 ^E	159 ± 115
	5	6	WBI + BMT + anti-CD45RB +anti-CD154	187	1.26, 1.43, 1.67, 1.73, 1.84, 1.90	1.64	176 ± 92 ^E	188 ± 127 ^E

A; WBI: whole body irradiation; BMT: bone marrow transplantation.

B; MT success ratio is the maximal number of dystrophin positive fibers found in whole muscle sections divided by the mean of the maximal number of dystrophin positive fibers in whole muscle sections of mice treated with FK506 (positive control group).

C; Analysis of muscle histology was performed after rechallenge with a second MT.

D; Significant increase compared with HA-3 ($p = 0,003$)

E; Significantly higher than FA-2 ($p < 0,01$)

counterparts treated with continuous FK506, regardless of whether MT was from haplo-allogeneic donors (> 100 days, Figure 7.3A-B and group HA-3 and > 170 days, group HA-4; Table 7.1) or fully allogeneic donors (> 180 days, Figure 7.3 C-D and group FA-5; Table 7.1). Alternatively, analyzed as percent of muscle fibers positive for dystrophin expression rather than total number of dystrophin fibers present, MT recipients in each group treated with this regimen (HA-3, HA-4, and FA-5) expressed dystrophin in at least 40% of the fibers present in a muscle cross-section.

In marked contrast to these results, very few dystrophin positive muscle fibers were detected in the muscles of control mice that received MT without immunosuppressive or tolerogenic treatment or which received BMT + anti-CD45RB alone (Table 7.1; groups HA-1, FA-1, and group FA-3, respectively). On the other hand, two out of four mice treated with BMT + anti-CD154 (group FA-4) expressed a significant number of dystrophin positive fibers >180 days after MT, showing a graft success ratio of 0.45 and 0.98 (i.e., the number of dystrophin positive fibers in a tolerized mouse divided by the mean number of dystrophin positive fibers in positive control group receiving a sustained immunosuppression with FK506) (Table 7.1). These were the same two mice that developed some degree of chimerism on previous analysis (Figure 7.1C, mice 4c and 4d). Nonetheless, the mouse 4d that exhibited transient chimerism (4.8% at 20 days) had less than half of the mean number of dystrophin positive muscle fibers seen in positive control mice treated with FK506 and was not tolerant to rechallenge with donor-type skin (see below). However, the mouse 4c treated with this regimen that developed long-term mixed chimerism, exhibited a high number of dystrophin positive fibers (group FA-4; Table 7.1). The remaining 2 mice in this treatment group displayed very few dystrophin positive fibers (similar to control untreated mdx mice). Thus, a conditioning regimen utilizing WBI + BMT + anti-CD154 is able to induce mixed chimerism and transplant tolerance in some mice, but is much less efficient than the regimen that also contains anti-CD45RB. Moreover, these data suggest a direct relationship between persistent chimerism and long-term MT survival.

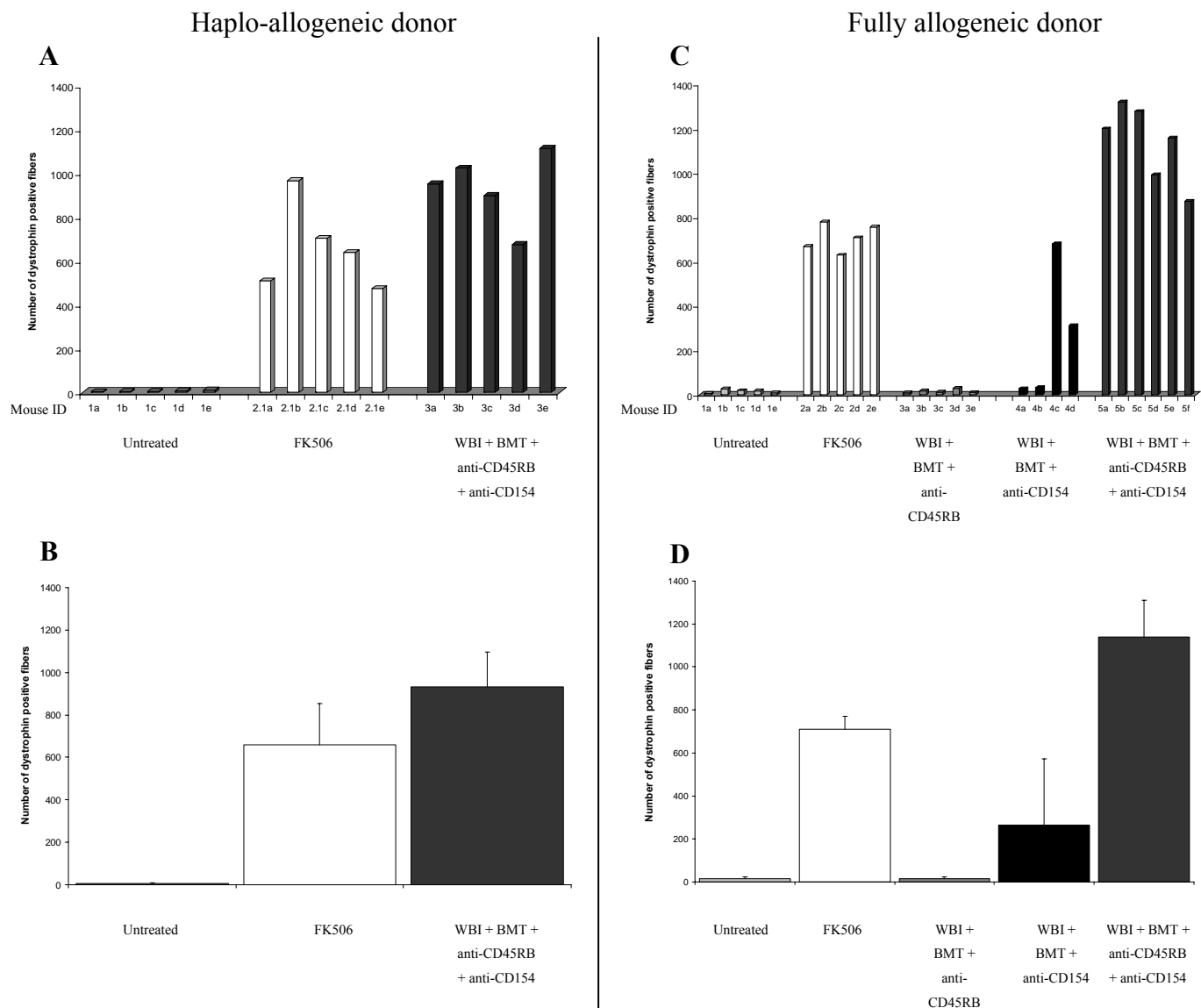


Figure 7.3. Long-term (> 100 days) expression of dystrophin in chimeric mice induced with non-myeloablative protocol. **A** and **B**. Individual and mean quantitative expression of dystrophin in TA muscle sections of mice that received MT from haplo-allogeneic donors after various treatment regimens (corresponding to groups HA-1, 2.1 and 3; Table 7.1). **C** and **D**. Individual and mean quantitative expression of dystrophin in TA muscle sections of mice that received MT from fully allogeneic donors (corresponding to groups FA-1, 2, 3, 4 and 5; Table 7.1).

Tolerance was not perturbed by rechallenge with myoblast or skin transplantation.

The persistence of mixed hemopoietic chimerism suggests ongoing tolerance to alloantigens. To determine whether mice exhibiting long-term survival of dystrophin positive muscle fibers after BMT were really tolerant, a second MT was performed by injecting haplo-allogeneic myoblasts into the contra-lateral TA muscle 95 days after the first MT in a set of five mice that had initially received tolerogenic (WBI + BMT + anti-CD45RB+ anti-CD154) therapy (Figure 7.4 and group HA-4, Tables 7.1 and 7.2). Dystrophin expression was examined in both injected TA muscles 173 days after the first MT (corresponding to 78 days after the second MT). As before, all mice receiving this regimen displayed high level dystrophin expression in the initial allograft suggesting that placement of the second allograft had no effect on graft survival of the original allograft (Figure 7.4A-B and group HA-4, Tables 7.1). Moreover, in each animal, the second allograft exhibited a high number of dystrophin positive fibers (Figure 7.4C-D and HA-4, Table 7.2) similar to that seen in the original allograft (HA-4, Tables 7.1).

In addition, we assessed donor-specific tolerance in mdx mice that received fully allogeneic BALB/c BMT/MT, by examining the survival of skin grafts placed 80 days after MT. Each mouse (treatment groups FA-3, 4, and 5; Table 7.1) received both BALB/c and third-party (CD1; outbred mouse) skin transplants. In mice treated with the tolerogenic regimen that included anti-CD45RB and anti-CD154 (group FA-5), all BALB/c skin grafts survived over 100 days whereas all third party skin grafts, were promptly rejected (MST 20 ± 3 days; Figure 7.5). Importantly, rejection of CD1 skin did not precipitate rejection of either the donor-specific skin graft or the original MT (analyzed 93 days after skin graft placement; Table 7.1). Thus, all mice receiving conditioning regimen including anti-CD45RB plus anti-CD154 exhibited robust long-lived donor specific tolerance.

In contrast, both BALB/c and CD1 skin grafts were promptly rejected by (non-chimeric) mice treated with WBI + BMT + either anti-CD45RB alone (group FA-3) or anti-CD154 alone (group FA-4). However, the one mouse treated with this latter regimen (WBI + BMT + anti-CD154; mouse 4c; Figures 7.1C and 3C) that developed long-term mixed chimerism, did not reject the BALB/c skin graft for over 100 days. On the other hand, the

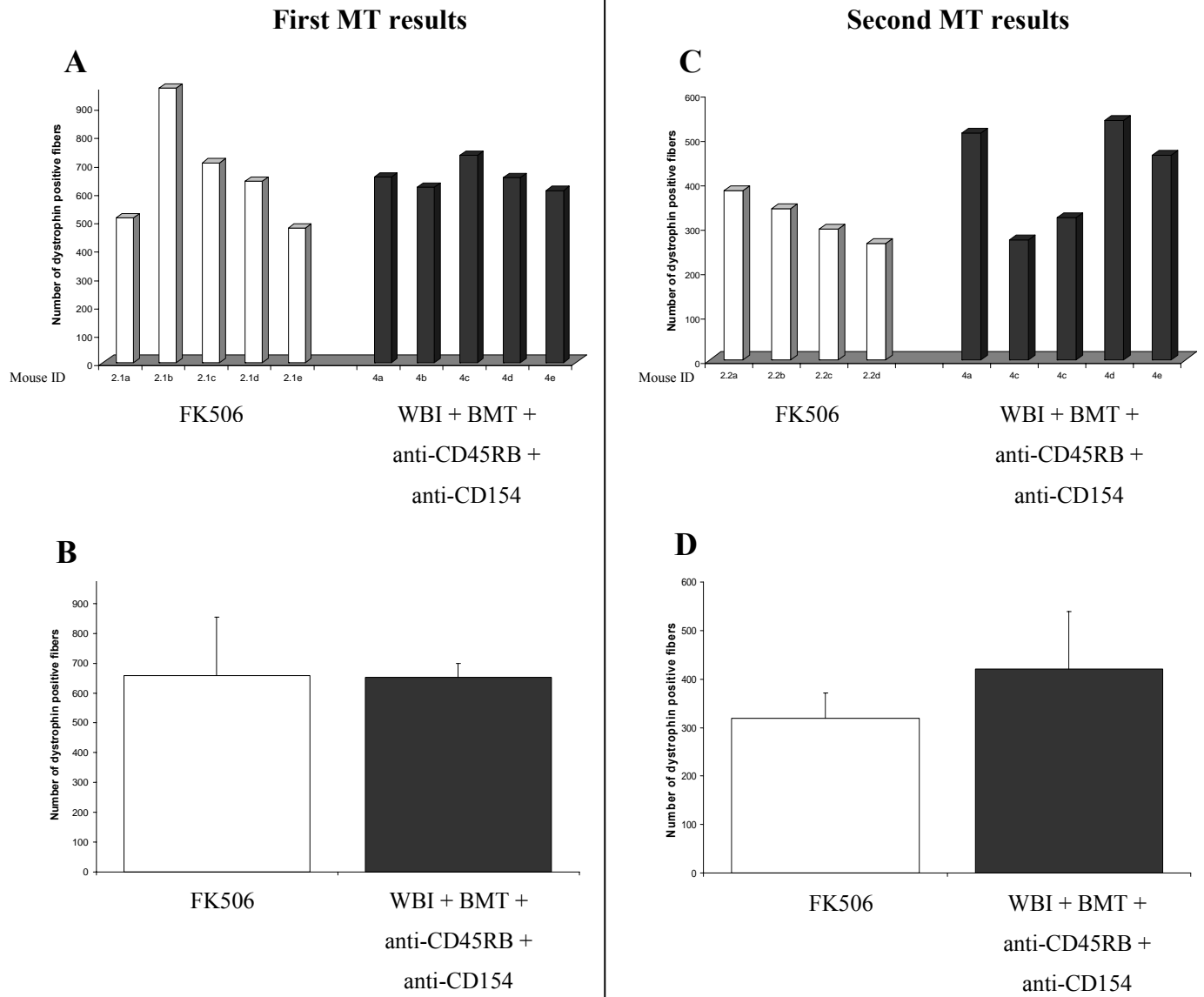


Figure 7.4. Rechallenge with a second MT from haplo-compatible donor could not break tolerance. **A and B.** Individual and mean quantitative expression of dystrophin in TA muscles that were injected with the first MT from haplo-allogeneic donor (> 170 days after MT). Comparison with the FK506 treated group for that particular experiment, sacrificed 30 days after MT (corresponding to groups HA-2.1 and 4; Table 7.1). **C and D.** Individual and mean quantitative expression of dystrophin in TA muscles examined >75 days after injection with a second MT and >170 days after receiving an initial MT (in the contralateral TA muscle). Comparison with the FK506 treated group for that particular experiment, sacrificed 30 days after MT (corresponding to groups HA-2.2 and 4; Table 7.2).

Table 7.2. Myoblast transplantation (MT) rechallenge results

Experiment	Group	n	Time after MT (days)	MT success ratio	Mean MT success ratio	Lymphocytic infiltration	
						CD4	CD8
Haplo-allogeneic (HA)	2.2	4	30 ^A	0.82, 0.92, 1.06, 1.19	1.00	143 ± 85	63 ± 21
	4	5	78 ^B	0.85, 1.00, 1.44, 1.60, 1.69	1.31	237 ± 52	214 ± 63 ^C

A; Control Group 2.2 received a single MT, daily FK506, and was analyzed 30 days later,

B; Rechallenge with second MT in the contra-lateral TA 95 days after the first MT and analyzed 78 days later

C; Significantly higher than HA-2.2 ($p = 0,01$)

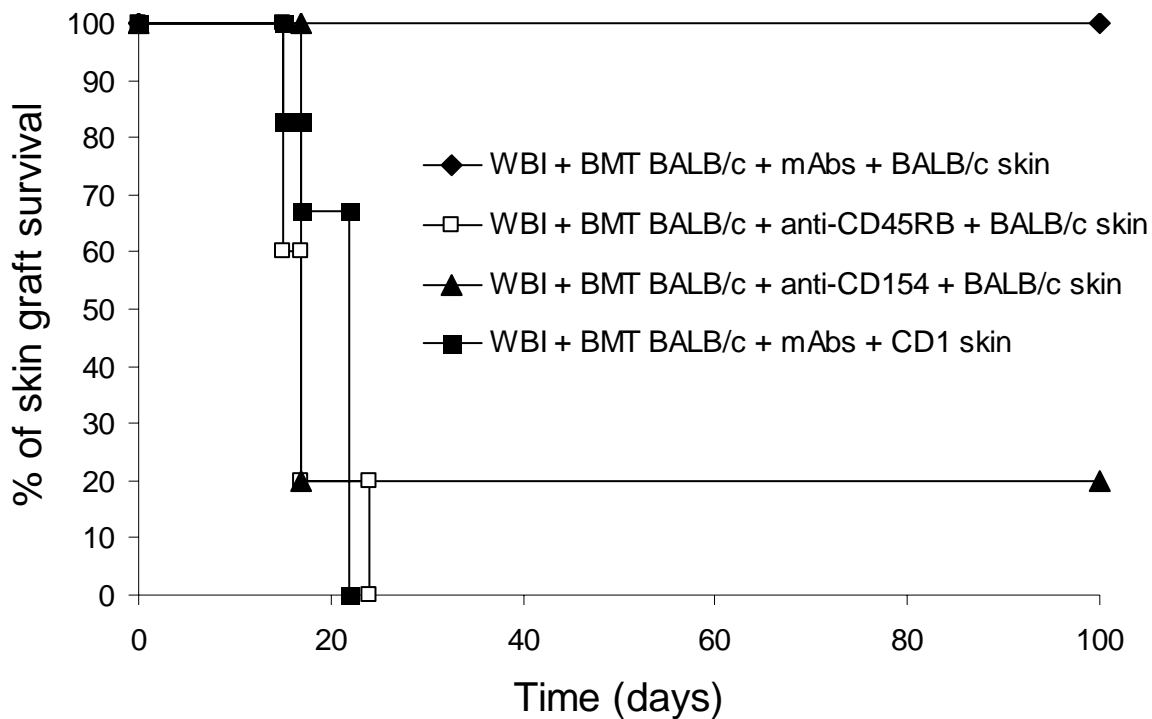


Figure 7.5. Robust donor-specific tolerance induced by WBI + fully-allogeneic BMT + anti-CD45RB + anti-CD154: Indefinite survival (> 100 days) of BALB/c skin grafts placed 80 days after same strain MT in mice that had received WBI + BMT BALB/c + anti-CD45RB + anti-CD154 (◆; n = 6). Third-party skin grafts (■; CD1) placed on these same mice were promptly rejected. Control groups that received WBI + BMT BALB/c + anti-CD45RB (□, n = 5), and WBI + BMT BALB/c + anti-CD154 (▲; n = 5) promptly rejected BALB/c skin grafts except for one mouse in that latter group that developed long-term chimerism.

transiently chimeric mouse in this treatment group, which maintained partial dystrophin expression after MT, did not exhibit any prolongation of skin allograft survival (Figure 7.5).

Clonal deletion of alloreactive T cells occurs in response to BMT after WBI, anti-CD45RB and anti-CD154.

We then determined whether or not our tolerogenic protocol resulted in deletion of recipient cells bearing anti-donor reactivity – a measure of central tolerance. To do this, V β T cell receptor (TCR) expression was used as a measure of anti-donor reactivity. Donor strain (BALB/c) mice express the MHC class II gene I-E, while the recipient strain (C57BL/10J mdx) does not. I-E is required to present superantigens encoded by mammary tumor viruses 8 and 9, which are incorporated into the genomes of both mouse strains. These superantigens, presented by I-E+ APC's, bind to thymocytes expressing the V β 11 or V β 5 T cell receptors, resulting in their deletion. Since BALB/c (donor) mice express the I-E gene, all T cells expressing V β 11 and V β 5 are deleted during intrathymic development. In contrast, since C57BL/10J mdx mice lack I-E expression, V β 11 and V β 5 expressing T cells are still present. After BMT, the presence of I-E+ donor-derived dendritic cells in the thymus would be expected to present these superantigens, resulting in deletion of host (H-2^b) T cells bearing V β 11. Thus, V β 11 can be used as a marker for the presence of donor-reactive host cells. As seen in Figure 7.6, we observed deletion of V β 11 TCR bearing CD4+ T cells in the peripheral blood of mice that received the tolerogenic treatment regimen (WBI + BMT + anti-CD45RB + anti-CD154) and fully allogeneic allografts. Percentages of V β 11 TCR CD4+ T cells were significantly different from untreated mdx mice ($p < 0.01$), and were similar to the low levels seen in peripheral blood CD4 cells from untreated BALB/c mice. As a control, the percentage of V β 8 CD4+ T cells, (which should not be deleted in any strain of mice), was tested. No significant differences in the percentage of CD4 cells expressing V β 8 were detected in mdx mice before and after receiving the tolerogenic BMT regimen, demonstrating specificity for deletion of V β 11 TCR bearing CD4+ T cells. Moreover, there were no significant differences in the percentages of V β 11 or V β 8 CD4+ T cells between groups that were treated with WBI + BMT + anti-CD45RB or WBI + BMT+ anti-CD154 (except for the single long-term chimeric mouse in that group (mouse 4c; Figure 7.1C), which showed V β 11 depletion; not

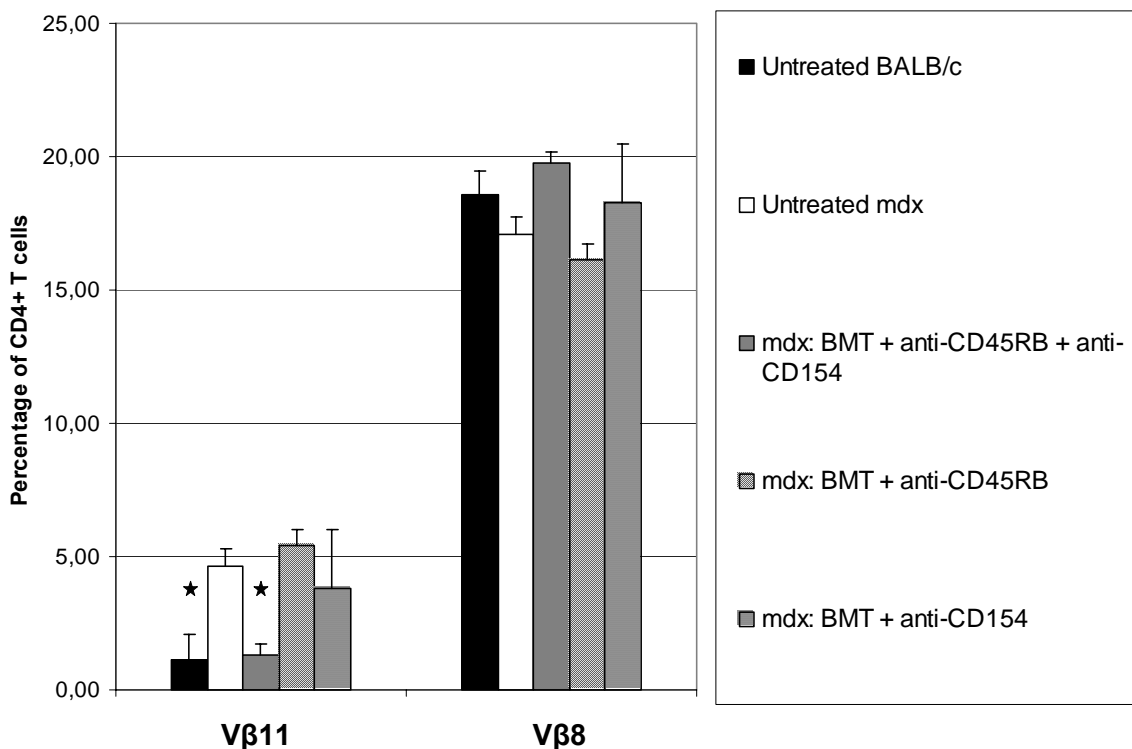


Figure 7.6. Deletion of donor-reactive peripheral CD4⁺ Vβ11⁺ host cells in long-term chimera receiving fully allogeneic (BALB/c) bone marrow cells after WBI and various treatment regimens: Mdx mice received either anti-CD45RB, anti-CD154 or both mAbs (groups FA-3, 4 and 5 respectively; n = 4-6 mice) in addition to WBI and BMT. Treatment groups were compared to untreated donor (BALB/c) and recipient (mdx) strain mice. Peripheral CD4⁺ cells in each treatment group were assessed on day 160 for expression of Vβ8⁺ (control) and Vβ11⁺ (donor reactive) TCR (*; p < 0.01 compared to untreated mdx mice).

shown), compared to untreated mdx mice. The absence of V β 11 depletion in the 2 groups that received a partial regimen, clearly indicates that regimens unable to induce mixed chimerism, were also unable to induce deletion. These results show that clonal deletion occurred and suggest its importance in the generation of central tolerance after bone marrow engraftment and non-myeloablative conditioning with WBI, anti-CD45RB and anti-CD154.

Tolerant mice exhibited a lymphocytic infiltrate in muscles that received MT but not in skin allografts.

At the time of sacrifice, we also examined allografts of mice receiving various treatment regimens for lymphocytic infiltration. To our surprise, despite evidence of deletion of alloreactive cells noted above, chimeric and tolerant mice receiving BMT, anti-CD45RB and anti-CD40L exhibited a patchy lymphocytic infiltrate containing both CD4 and CD8 cells (Figure 7.7A; Table 7.1). As seen, although focal, in some areas the infiltrate was quite dense. In recipients of haplo-allogeneic MT, this infiltrate was similar to control mice receiving FK506. Moreover, the number of infiltrating CD4 cells was similar at 103 and 173 days in the primary grafts (groups HA-3 vs. HA-4), and in group HA-4, similar findings were observed in both the primary and second MT (Table 7.1 vs. 7.2). However, there was a statistically significant increase in the number of infiltrating CD8⁺ cells at 173 compared to 103 days in the primary grafts (Groups HA-3 vs. HA-4; $p = 0.003$). Although CD8⁺ infiltration into the second MT was not significantly different from either primary MT, it was significantly higher than in control mice treated with FK506 (groups HA-4 vs. HA-2.2, Table 7.2; $p = 0.01$). Regardless, it should be emphasized that these infiltrates were focal and represent only a small fraction of what is usually observed in actively rejecting MT (not shown).

The TA muscles of tolerant chimeric recipients of fully allogeneic BMT and MT, contained a similar infiltrate to that seen in tolerant recipients of haplo-allogeneic transplants noted above (Group FA-5 vs. HA-3 and HA-4; Tables 7.1 and 7.2 and Figure 7.7). Interestingly, accepted skin grafts (100 days) in these very same mice exhibited absolutely no signs of infiltration (Figure 7.7E). All skin grafts looked healthy with normal dermal structures, as compared to syngenic BALB/c skin grafts.

Further evaluation revealed that CD4 and CD8 cells infiltrating the transplanted muscles in tolerant recipients were of both donor and recipient origin (Figures 7.7B and C). Similar staining was observed in groups that received haplo and fully allogeneic MT (except that H2b staining in haplo-allogeneic recipients could not differentiate cells of host origin, since it is also expressed on donor cells).

In muscles of non-chimeric (non-tolerant) mice conditioned with irradiation and anti-CD45RB or anti-CD40L alone, there were relatively few lymphocytes and muscles were of smaller diameter suggesting previous rejection of transplanted myoblasts and fiber drop-out due to high turn-over (Table 7.1 and data not shown). (The mouse 4d in group FA-4 with transient chimerism, exhibited a several-fold increase in infiltrating CD4 and CD8 cells compared to tolerant mice).

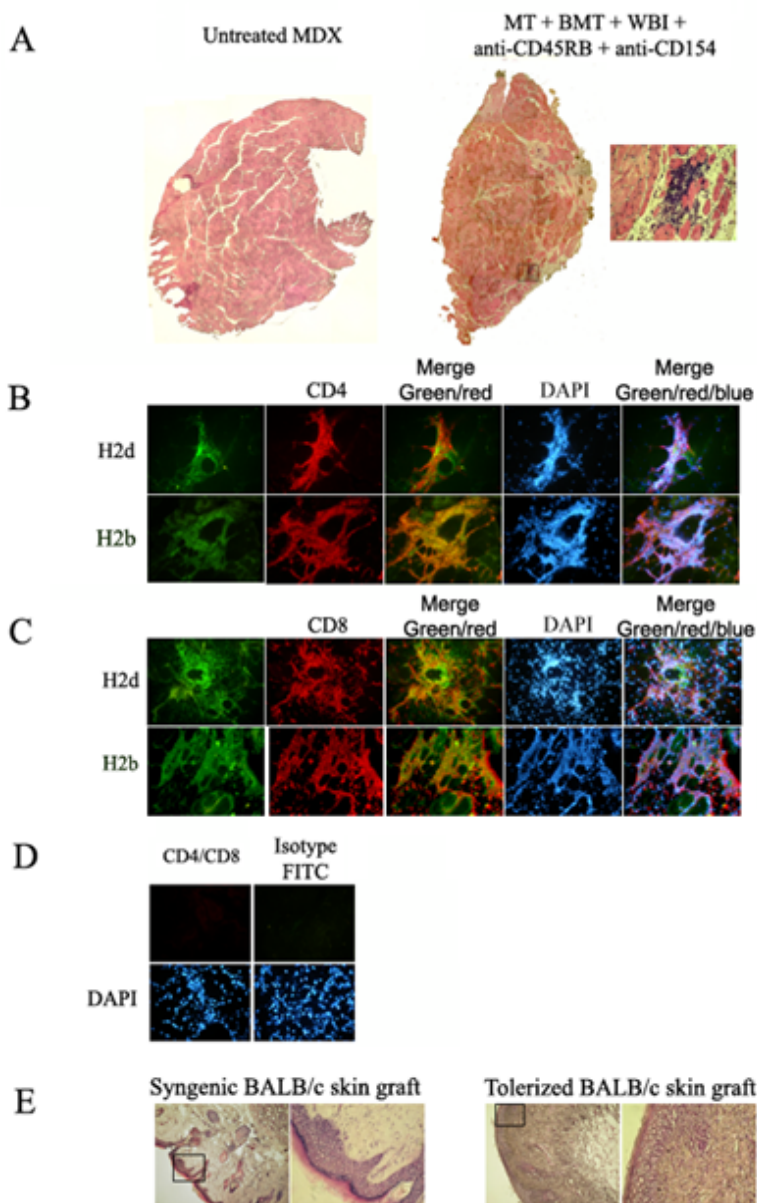


Figure 7.7. Representative histological analysis of muscle and skin graft sections: **A**. Hematoxylin/eosin staining of muscle sections from an untreated mdx mouse (left; magn. 25X) and a tolerized mouse (right; magn. 25X and 400X). **B**. Staining of infiltrating CD4 cells was positive for donor (H2d) and host (H2b) (magn. 400X). **C**. Staining of infiltrating CD8 cells was positive for donor (H2d) and host (H2b) (magn. 400X). **D**. Typical control isotype staining (magn. 400X). **E**. Hematoxylin/eosin staining of skin graft sections that survived >100 days from a syngenic BALB/c (left) vs. a tolerized mouse (right) (magn. 25X and 400X). Of note, intense staining in panels B and C were caused by dense cellular infiltration, making individual cells hard to identify by fluorescence.

7.8 Discussion

One of the most promising approaches for development of robust immunological tolerance targets the central immune system, through the development of mixed hematopoietic chimerism (14). In this manuscript, we demonstrate for the first time that tolerance to allogeneic myoblasts can be achieved using a novel combination of anti-CD45RB and anti-CD154 mAbs to enhance bone marrow engraftment. This protocol proved very effective as all treated mice developed high and sustained levels of hemopoietic chimerism and donor-specific tolerance to rechallenge with allogeneic skin or myoblasts.

To date, no effective treatment exists for DMD. However, several unique features of skeletal muscle make MT a particularly attractive candidate. Firstly, muscle fibers are normally continuously repaired by stem cell-like satellite cells which become activated and proliferate as myoblasts *in vivo*. The proliferative capacity of myoblasts lends itself to their propagation *in vitro*. Finally, because muscle fibers are formed by a cellular syncytia, the fusion of myoblasts carrying wt dystrophin is a ready means of providing the dystrophin gene to pre-existent muscle fibers initially lacking a normal dystrophin gene. Importantly, the introduction of dystrophin into mdx mice by MT has been shown to protect muscle against damage during eccentric exercise (23).

However, other features make myoblast transplantation less than ideal. Although myoblasts can fuse locally, they are non-motile and therefore treatment will require multiple injections of myoblasts into each muscle, approximately 1 mm apart (24). Moreover, several sessions would be needed to treat all major skeletal muscles of a patient. Thus, development of robust and durable tolerance will be important if retreatment of patients before each round of injections is to be avoided.

In hopes of improving dissemination, several groups have attempted to use more primitive muscle-derived stem cells (25-27). However, thus far, systemic delivery of such cells has only led to minimal dystrophin expression in muscle fibers of mdx mice. In contrast, we now demonstrate that the induction of tolerance to MT allows stable high level engraftment with over 40% of muscle fibers expressing dystrophin. Moreover, we have

shown that excellent distribution of myoblasts can be achieved even when transplanted into larger muscles of non-human primates (e.g. biceps of rhesus macaques) with up to 70% of the fibers expressing a donor gene (28). Based on the murine studies noted above (23), stable introduction of dystrophin is expected to improve strength, quality of life, and life span of DMD patients. It should be however emphasized that the tolerigenic treatment presented here can also be used to develop immunological tolerance to allogeneic stem cells delivered systemically if this type of delivery is eventually improved.

The largest hurdle for allogeneic myoblast transplantation has been the need for chronic immunosuppression. In murine models and in monkeys, continual therapy with the calcineurin inhibitor FK506 has been quite effective in maintaining myoblast survival ((20, 28) and Figure 7.2). Unfortunately, long term use of immunosuppression is associated with adverse effects including increased susceptibility to infection, malignancy, cardiovascular disease, neurotoxicity, and nephrotoxicity (29, 30). Thus, induction of donor-specific tolerance would provide an important advantage over sustained immunosuppression for MT.

We first attempted to induce peripheral tolerance using either anti-CD154 plus DST, or anti-CD45RB with or without anti-CD154 ((12) and manuscript in preparation). Despite the ability of these protocols to induce long-term engraftment in a number of murine transplant models, muscles injected with allogeneic myoblasts were highly infiltrated with CD4⁺ and CD8⁺ cells (4-5 fold more T cells than seen in tolerant chimeric mice). Only 20% of recipients exhibited survival of transplanted myoblasts past 100 days.

These results suggest that MT is highly immunogenic. Indeed, several features of MT are likely to contribute to this immunogenicity. Firstly, multiple close injections result in an intense local inflammatory reaction. This tissue damage is likely to augment the innate immune response and heighten both MHC class II expression and antigen presentation. In this regard, when stimulated with inflammatory cytokines, myoblasts can express both class II MHC and B7 costimulatory molecules and activate cytotoxic lymphocytes *in vitro* (31-33). Thus, myoblasts may be capable of acting as antigen presenting cells, and enhancing their own rejection. In addition, after fusion, muscle fibers express dystrophin, which can act as a neoantigen ((34) and see below).

Recent studies have demonstrated that bone marrow stem cells can also differentiate into muscle tissue (27, 35). However, after receiving BMT from normal donors, only a low percentage of dystrophin positive fibers were found in muscles of mice (3.5%) or patients (0.5-0.9%) (36, 37). Thus, we do not believe that the bone marrow transplantation in and of itself contributed significantly to the dystrophin expression observed in our studies.

A number of non-myeloablative protocols have been developed for the induction of mixed chimerism (14). Several studies have demonstrated that anti-CD154 combined with low-dose irradiation can induce mixed chimerism and central tolerance (38, 39). An important role for costimulatory blockade in this setting is to inhibit alloreactive peripheral T cells of the host, allowing for donor bone marrow engraftment and establishment of mixed chimerism. In this regard, such non-myeloablative protocols combine elements of both peripheral and central tolerance. However, in our model anti-CD154 plus low dose irradiation was not sufficient to consistently promote long-term chimerism or tolerance to MT. We now demonstrate that anti-CD45RB and anti-CD40L are synergistic in inducing mixed chimerism and central tolerance. Only the combination of these mAbs resulted in high level and long-lived mixed chimerism in all treated mice. Moreover, the presence of persistent mixed chimerism correlated directly with: deletion of allo-reactive recipient cells, survival of primary MT, tolerance to a second MT, and donor-specific tolerance to a skin transplant placed 80 days after the primary allograft. Although the exact mechanism by which anti-CD45RB contributes to tolerance induction by BMT + anti-CD40L is not yet certain, anti-CD45RB clearly enhanced the generation of mixed chimerism in this setting. In this regard, anti-CD45RB has been shown to promote peripheral tolerance through a unique mechanism involving upregulation of CTLA-4 on CD4 cells (40). In addition, anti-CD45RB promotes survival of skin grafts in models where rejection is mediated in part by costimulatory blockade-resistant CD8 cells (11, 41). Both mechanisms may contribute to the synergistic effects of anti-CD45RB in induction of mixed chimerism and tolerance.

The requirement of anti-CD45RB for tolerance in our protocol may also reflect differences specific to MT. In this regard, the presence of a CD4 and CD8 infiltrate in dystrophin-expressing muscle of mice that were tolerant to a second MT, or to skin, is of particular interest. These mice exhibited high levels of mixed chimerism and deletion of

donor-reactive T cells. In cardiac transplant models, mixed chimerism and tolerance has been associated with a complete lack of lymphocytic infiltration (42). Indeed, skin grafts on tolerant mice bearing MT in our model also lacked lymphocytic infiltration. These findings suggest that MT has distinct features not seen in other allograft models. They also raise a question as to the nature of the specific graft-reactive infiltrate in this setting. Both donor and recipient derived CD4 and CD8 cells were observed. Moreover, these CD8 cells appeared to have cytotoxic potential since they expressed perforin (data not shown). If graft infiltrating recipient T cells were reacting to donor alloantigen, skin allografts (of donor origin) should also be infiltrated. This raises the possibility that recipient peripheral T cells in the graft were actually reactive to neoantigens such as dystrophin, expressed in the treated muscle. Previous studies where wild-type myoblasts were transplanted into mdx mice demonstrated that such reactivity can occur (34 , 43). Indeed, thymic and/or peripheral deletion of alloantigen reactive T cells by donor marrow elements would not be expected to detect or delete dystrophin-reactive host cells. Donor cells in the graft are also unlikely to be alloreactive against host MHC, since these mice exhibited no signs of GVHD. This raises the possibility that dystrophin does not normally participate in thymic selection, and can become antigenic in the periphery in the setting of localized inflammation. Alternatively, T cells already present within the donor marrow inoculum could react to dystrophin peptides displayed on recipient MHC. Elucidation of the antigen specificity of these cells will require further investigation, for example using non-dystrophic animals. Regardless, the fact that this infiltrate appears not to progress or damage the graft suggests that in this setting, peripheral mechanisms may play an ongoing role in maintaining allograft tolerance.

The combination of anti-CD154 and anti-CD45RB in this regimen was extremely well tolerated. None of the mice developed any signs of illness, and GVHD was not apparent. Importantly, mice maintained reactivity to unrelated antigenic challenges. Moreover, rejection of a third party skin graft did not break tolerance to either skin or the primary MT. Thus, tolerance was robust, donor-specific, and durable. These features are particularly important in clinical application for DMD where multiple injections of myoblasts will be required.

This non-myeloablative protocol may be applicable to clinical myoblast transplantation and treatment of DMD. Although conditioning with 3 Gy total body irradiation was empirically used prior to BMT, it is possible that it can be replaced with a more marrow-specific cytoreductive agent such as Busulfan. This would further limit toxicity and enhance acceptability. Reducing the risk to benefit ratio would pave the way for use of this robust tolerogenic protocol in other types of solid organ and cellular transplantation.

7.9 Acknowledgments

We would like to thank Maurice Dufour for FACS analysis.

7.10 References

1. Hoffman, E. P., R. H. Brown, Jr., and L. M. Kunkel. 1987. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51:919.
2. 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* 337:176.
3. Guerette, B., R. Roy, M. Tremblay, I. Asselin, I. Kinoshita, J. Puymirat, and J. P. Tremblay. 1995. Increased granzyme B mRNA after alloincompatible myoblast transplantation. *Transplantation* 60:1011.
4. Huard, J., R. Roy, J. P. Bouchard, F. Malouin, C. L. Richards, and J. P. Tremblay. 1992. Human myoblast transplantation between immunohistocompatible donors and recipients produces immune reactions. *Transplant Proc* 24:3049.
5. 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* 55:687.
6. Markees, T. G., N. E. Phillips, R. J. Noelle, L. D. Shultz, J. P. Mordes, D. L. Greiner, and A. A. Rossini. 1997. Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand. *Transplantation* 64:329.
7. Larsen, C. P., D. Z. Alexander, D. Hollenbaugh, E. T. Elwood, S. C. Ritchie, A. Aruffo, R. Hendrix, and T. C. Pearson. 1996. CD40-gp39 interactions play a critical role during allograft rejection. Suppression of allograft rejection by blockade of the CD40-gp39 pathway. *Transplantation* 61:4.
8. Parker, D. C., D. L. Greiner, N. E. Phillips, M. C. Appel, A. W. Steele, F. H. Durie, R. J. Noelle, J. P. Mordes, and A. A. Rossini. 1995. Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9560.
9. Basadonna, G. P., L. Auersvald, C. Q. Khuong, X. X. Zheng, N. Kashio, D. Zekzer, M. Minozzo, H. Qian, L. Visser, A. Diepstra, A. I. Lazarovits, S. Poppema, T. B.

- Strom, and D. M. Rothstein. 1998. Antibody-mediated targeting of CD45 isoforms: a novel immunotherapeutic strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3821.
10. Lazarovits, A. I., S. Poppema, Z. Zhang, M. Khandaker, C. E. Le Feuvre, S. K. Singhal, B. M. Garcia, N. Ogasa, A. M. Jevnikar, M. H. White, G. Singh, C. R. Stiller, and R. Z. Zhong. 1996. Prevention and reversal of renal allograft rejection by antibody against CD45RB. *Nature* 380:717.
 11. Rothstein, D. M., M. F. Livak, K. Kishimoto, C. Ariyan, H. Y. Qian, S. Fecteau, M. Sho, S. Deng, X. X. Zheng, M. H. Sayegh, and G. P. Basadonna. 2001. Targeting signal 1 through CD45RB synergizes with CD40 ligand blockade and promotes long term engraftment and tolerance in stringent transplant models. *J Immunol* 166:322.
 12. Camirand, G., N. J. Caron, N. A. Turgeon, A. A. Rossini, and J. P. Tremblay. 2002. Treatment with anti-CD154 antibody and donor-specific transfusion prevents acute rejection of myoblast transplantation. *Transplantation* 73:453.
 13. Ildstad, S. T., and D. H. Sachs. 1984. Reconstitution with syngeneic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts or xenografts. *Nature* 307:168.
 14. Sykes, M. 2001. Mixed chimerism and transplant tolerance. *Immunity* 14:417.
 15. Ito, H., J. Kurtz, J. Shaffer, and M. Sykes. 2001. CD4 T cell-mediated alloresistance to fully MHC-mismatched allogeneic bone marrow engraftment is dependent on CD40-CD40 ligand interactions, and lasting T cell tolerance is induced by bone marrow transplantation with initial blockade of this pathway. *J Immunol* 166:2970.
 16. Wekerle, T., M. H. Sayegh, J. Hill, Y. Zhao, A. Chandraker, K. G. Swenson, G. Zhao, and M. Sykes. 1998. Extrathymic T cell deletion and allogeneic stem cell engraftment induced with costimulatory blockade is followed by central T cell tolerance. *J Exp Med* 187:2037.
 17. Cossu, G., B. Zani, M. Coletta, M. Bouche, M. Pacifici, and M. Molinaro. 1980. In vitro differentiation of satellite cells isolated from normal and dystrophic mammalian muscles. A comparison with embryonic myogenic cells. *Cell Differ* 9:357.
 18. Wakeford, S., D. J. Watt, and T. A. Partridge. 1991. X-irradiation improves mdx mouse muscle as a model of myofiber loss in DMD. *Muscle Nerve* 14:42.

19. Harris, J. B., M. A. Johnson, and E. Karlsson. 1974. Proceedings: Histological and histochemical aspects of the effect of notexin on rat skeletal muscle. *Br J Pharmacol* 52:152P.
20. Kinoshita, I., J. T. Vilquin, B. Guerette, I. Asselin, R. Roy, and J. P. Tremblay. 1994. Very efficient myoblast allotransplantation in mice under FK506 immunosuppression. *Muscle Nerve* 17:1407.
21. Unkeless, J. C. 1979. Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J Exp Med* 150:580.
22. Hoffman, E. P., J. E. Morgan, S. C. Watkins, and T. A. Partridge. 1990. Somatic reversion/suppression of the mouse mdx phenotype in vivo. *J Neurol Sci* 99:9.
23. 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* 250:321.
24. Skuk, D., and J. P. Tremblay. 2000. Progress in myoblast transplantation: a potential treatment of dystrophies. *Microsc Res Tech* 48:213.
25. Lee, J. Y., Z. Qu-Petersen, B. Cao, S. Kimura, R. Jankowski, J. Cummins, A. Usas, C. Gates, P. Robbins, A. Wernig, and J. Huard. 2000. Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J Cell Biol* 150:1085.
26. Cao, B., B. Zheng, R. J. Jankowski, S. Kimura, M. Ikezawa, B. Deasy, J. Cummins, M. Epperly, Z. Qu-Petersen, and J. Huard. 2003. Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential. *Nat Cell Biol* 5:640.
27. 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* 401:390.
28. Skuk, D., M. Goulet, B. Roy, and J. P. Tremblay. 2000. Myoblast transplantation in whole muscle of nonhuman primates. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:197.
29. Bennett, W. M. 1998. The nephrotoxicity of new and old immunosuppressive drugs. *Ren Fail* 20:687.

30. Neu, A. M., S. L. Furth, B. W. Case, B. Wise, P. M. Colombani, and B. A. Fivush. 1997. Evaluation of neurotoxicity in pediatric renal transplant recipients treated with tacrolimus (FK506). *Clin Transplant* 11:412.
31. Garlepp, M. J., W. Chen, H. Tabarias, M. Baines, A. Brooks, and J. McCluskey. 1995. Antigen processing and presentation by a murine myoblast cell line. *Clin Exp Immunol* 102:614.
32. Goebels, N., D. Michaelis, H. Wekerle, and R. Hohlfeld. 1992. Human myoblasts as antigen-presenting cells. *J Immunol* 149:661.
33. Curnow, J., L. Corlett, N. Willcox, and A. Vincent. 2001. Presentation by myoblasts of an epitope from endogenous acetylcholine receptor indicates a potential role in the spreading of the immune response. *J Neuroimmunol* 115:127.
34. 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* 131:975.
35. Ferrari, G., G. Cusella-De Angelis, M. Coletta, E. Paolucci, A. Stornaiuolo, G. Cossu, and F. Mavilio. 1998. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279:1528.
36. LaBarge, M. A., and H. M. Blau. 2002. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 111:589.
37. 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* 110:807.
38. Durham, M. M., A. W. Bingaman, A. B. Adams, J. Ha, S. Y. Waitze, T. C. Pearson, and C. P. Larsen. 2000. Cutting edge: administration of anti-CD40 ligand and donor bone marrow leads to hemopoietic chimerism and donor-specific tolerance without cytoreductive conditioning. *J Immunol* 165:1.

39. Taylor, P. A., C. J. Lees, H. Waldmann, R. J. Noelle, and B. R. Blazar. 2001. Requirements for the promotion of allogeneic engraftment by anti-CD154 (anti-CD40L) monoclonal antibody under nonmyeloablative conditions. *Blood* 98:467.
40. Fecteau, S., G. P. Basadonna, A. Freitas, C. Ariyan, M. H. Sayegh, and D. M. Rothstein. 2001. CTLA-4 up-regulation plays a role in tolerance mediated by CD45. *Nat Immunol* 2:58.
41. Trambley, J., A. W. Bingaman, A. Lin, E. T. Elwood, S. Y. Waitze, J. Ha, M. M. Durham, M. Corbascio, S. R. Cowan, T. C. Pearson, and C. P. Larsen. 1999. Asialo GM1(+) CD8(+) T cells play a critical role in costimulation blockade-resistant allograft rejection. *J Clin Invest* 104:1715.
42. Shirasugi, N., A. B. Adams, M. M. Durham, A. E. Lukacher, H. Xu, P. Rees, S. R. Cowan, M. A. Williams, T. C. Pearson, and C. P. Larsen. 2002. Prevention of chronic rejection in murine cardiac allografts: a comparison of chimerism- and nonchimerism-inducing costimulation blockade-based tolerance induction regimens. *J Immunol* 169:2677.
43. Ohtsuka, Y., K. Udaka, Y. Yamashiro, H. Yagita, and K. Okumura. 1998. Dystrophin acts as a transplantation rejection antigen in dystrophin-deficient mice: implication for gene therapy. *J Immunol* 160:4635.

Discussion Générale

La tolérance immunologique peut être obtenue selon deux approches : une modulation du système immunitaire périphérique ou une modulation centrale. Ces deux approches ont été examinées dans cette thèse, et seule la modulation centrale, par développement de chimérisme mixte, a permis la survie de greffes de myoblastes à long-terme.

La faible survie des myoblastes à long terme par l'utilisation de protocoles d'induction de tolérance périphérique, efficaces pour d'autres types de transplantation, semble démontrer une immunogénicité accrue. Plusieurs facteurs peuvent être responsables de cet accroissement de l'immunogénicité. Premièrement, les multiples injections dans le tissu musculaire lors des greffes de myoblastes provoquent une forte inflammation. Chaque injection endommage le tissu musculaire, induisant ainsi les premiers signaux inflammatoires et attirant la première ligne de défense du système immunitaire inné : les phagocytes. Plus l'inflammation est importante, plus grande est l'infiltration par les cellules phagocytaires. Ces cellules phagocytaires jouent un rôle majeur dans la présentation d'antigènes. Donc, en décuplant le nombre de CPA au niveau des organes lymphoïdes secondaires, un plus grand nombre de lymphocytes seront activés, augmentant ainsi la réponse immunitaire. Le deuxième facteur qui pourrait augmenter l'immunogénicité des myoblastes est leur capacité intrinsèque à agir comme CPA. Il a été démontré que ces cellules pouvaient exprimer le CMH de classe II ainsi que les molécules de co-stimulation B7-1 et B7-2, sous stimulation à l'interféron- γ (Goebels et al. 1992; Garlepp et al. 1995). Ces caractéristiques spécifiques aux CPA leur permettraient d'activer le système immunitaire de l'hôte de manière directe. Par contre, cette capacité leur est inefficace si cette présentation d'antigène ne s'effectue pas au niveau des organes lymphatiques secondaires. Il a été précédemment démontré que des greffes de peaux allogéniques ne sont pas rejetées chez les souris qui ne possèdent pas d'organes lymphoïdes secondaires, démontrant ainsi l'importance de la présentation antigénique dans ces organes (Lakkis et al. 2000). La démonstration de la présence de myoblastes du donneur au niveau des ganglions

lymphatiques suite à une greffe de ces cellules représenterait un point important pour appuyer leur immunogénicité.

Les résultats obtenus avec le protocole de tolérance centrale combinant l'anti-CD8, l'anti-CD154 et BMT (Chapitre 6), démontrent que l'utilisation de donneurs semi-allogéniques et complètement allogéniques résulte en des taux de chimérisme différents. En effet, l'utilisation de donneurs complètement allogéniques a résulté en un développement de chimérisme à long terme majoritairement transitoire. Cette différence peut être attribuable à une activation des lymphocytes T CD8 et/ou des cellules NK plus importante dans le cas des donneurs complètement allogéniques. Les lymphocytes T CD8 sont restreints à la présentation antigénique par les CMH de classe I. En transplantant des cellules de moelle provenant de donneurs semi-allogéniques, l'activation des lymphocytes T CD8 est diminuée puisque chaque cellule exprimera les CMH du donneur et du receveur. En utilisant des donneurs complètement allogéniques, seuls les CMH du donneur sont exprimés, augmentant leur immunogénicité. Les cellules NK pour leur part reconnaissent les molécules de classe I par leurs récepteurs Ly-49 et CD94/NKG2. Leur activation est dépendante de cette liaison avec le CMH de classe I. Ainsi, lors d'une transplantation de moelle provenant de donneurs semi-allogéniques, les cellules NK ne seront pas activées, puisqu'elles présentent la même molécule de classe I que le donneur. Dans le cas des transplantations effectuées avec des donneurs complètement allogéniques, les molécules de classe I sont complètement différentes du donneur, augmentant ainsi leur immunogénicité par une activation accrue des lymphocytes CD8 et NK. De plus, il a été récemment démontré par le groupe du Dr Sykes que le développement de chimérisme par l'utilisation du protocole mentionné plus haut, n'induit pas de cellules T régulatrices (Kurtz et al. 2001). Cette démonstration pourrait se confirmer dans nos expériences puisque l'activation de certains clones CD8 alloréactifs, n'ayant pas été déléétés au moment de l'initiation du protocole, ne seraient pas inactivés par les lymphocytes T régulateurs et pourraient causer la perte du chimérisme à long terme. Nous avons vérifié le taux de déplétion induit par l'anti-CD8 utilisé dans nos expériences et nous avons constaté que quelques clones CD8 subsistaient dans la rate et les ganglions lymphatiques (< 1%; données non incluses dans la thèse). Il reste à déterminer si la survie de ces quelques lymphocytes auraient pu causer le rejet à long terme.

Le chimérisme transitoire obtenu chez la majorité des souris recevant une greffe de cellules de moelle allogéniques et le protocole non-myéloablatif (Chapitre 6; TBI + anti-CD8 + anti-CD154), démontre que l'activation des lymphocytes CD8 et des cellules NK s'est effectuée tardivement. Le manque de données sur le chimérisme à différents temps après la BMT ne nous permet pas de relier la réapparition des lymphocytes CD8 avec la diminution du taux de chimérisme. Il est par contre clair que, chez les souris qui ont développé du chimérisme transitoire, les greffes de peaux ont commencé à être rejetées environ 90 jours après leur greffe. On pourrait supposer que la diminution du taux de chimérisme ait atteint le point critique environ 90 jours après la BMT. Nous avons noté une différence entre le taux survie des greffes de peaux et des greffes de myoblastes chez les souris dont le chimérisme était transitoire. En effet, toutes les greffes de peaux ont été rejetées à long terme tandis que les fibres musculaires hybrides formées par les myoblastes greffés ont survécu chez 56% (5/9) des souris. Il est difficile de spéculer sur les raisons de cette différence. Il est possible qu'à plus long terme, les fibres musculaires hybrides auraient été rejetées, puisque la présentation par les CMH de classe I et II par les fibres matures ne s'effectue que dans les cas de régénération musculaire. Dans la peau par contre, plusieurs CPA résidentes peuvent présenter et activer le système immunitaire plus rapidement, augmentant ainsi la rapidité du rejet.

L'addition de l'anti-CD45RB aux protocoles non-myéloablatif (Chapitre 7) a permis d'obtenir d'excellent taux de chimérisme chez 100% des souris et en utilisant des donneurs semi-allogéniques ou complètement allogéniques. Ce résultat démontre que l'utilisation de l'anti-CD45RB, au lieu de l'anticorps déplétant les lymphocytes CD8, est plus efficace. Quelques hypothèses peuvent être émises face à ce potentiel amélioré. Premièrement, il a été démontré que lors de la combinaison des souches de souris BALB/c et B6 ou B10 en transplantation, certains clones CD8 alloréactifs résistent à l'inactivation par les anticorps bloquant les signaux de co-activation (Trambley et al. 1999). Certains résultats préliminaires effectués au laboratoire du Dr Rothstein, suggèrent que l'anti-CD45RB affecte la survie des lymphocytes CD8. Il serait donc logique de penser que la différence observée sur le taux de chimérisme à long terme en comparant les protocoles du Chapitre 6 et du Chapitre 7 et en utilisant des donneurs allogéniques serait causé par une élimination totale ou quasi-totale des clones CD8 alloréactifs par l'ajout de l'anti-CD45RB. Une autre

hypothèse complémentaire serait le développement de lymphocytes T régulateurs, qui produirait une suppression efficace des clones alloréactifs, permettant ainsi le développement de chimérisme et la survie des greffes à long terme. Par contre, aucune évidence à ce jour ne suggère l'implication de ce type de cellules pour la survie et la prise de greffe de moelle osseuse. Cependant l'induction et l'importance de ces cellules régulatrices a été largement démontré dans plusieurs types de transplantation impliquant le système périphérique seulement. En plus, des résultats préliminaires obtenus au laboratoire du Dr Rothstein démontrent que l'utilisation de l'anti-CD45RB dans un modèle inflammatoire du petit intestin, induit ce type cellulaire régulateur, permet la diminution de l'inflammation et la survie des souris. Par contre, cette hypothèse au niveau de protocoles d'induction de tolérance centrale avec l'utilisation de l'anti-CD45RB reste à démontrer.

Suite au développement de chimérisme et à la greffe de myoblastes, nous avons fréquemment observé la présence de foyers d'infiltrations lymphocytaires dans les muscles ayant reçu des injections de myoblastes. Un fait à noter est que cette infiltration était quantitativement beaucoup moindre (4 à 5 fois), comparé aux expériences de tolérance périphérique. En plus, aucune infiltration cellulaire n'a été observée dans les greffes de peaux, qui, dans certains cas, étaient effectuées sur les mêmes souris. Cette absence d'infiltration dans les greffes de peaux démontre que les lymphocytes infiltrants ne réagissent pas contre des antigènes des CMH. Il est donc plausible de penser que ces lymphocytes infiltrants réagissent contre des antigènes, spécifiques au tissu musculaire. Étant donné l'absence d'expression de la dystrophine chez les souris *mdx*, il est possible d'envisager une réactivité lymphocytaire contre cette protéine. En plus, les lymphocytes nouvellement formés suite à une greffe de moelle ne seraient pas sélectionnés négativement contre la dystrophine, ce qui causerait une infiltration lymphocytaire dans les muscles. Un groupe a démontré l'expression de dystrophine par RT-PCR dans le thymus, mais l'expression de la protéine n'a pas été prouvée par Western Blot (Tokarz et al. 1998). En plus, cette étude ne spécifie pas dans quel type cellulaire thymique l'ARNm de la dystrophine est détecté. Il existe aussi la possibilité que d'autres protéines musculaires pourraient agir comme antigène, dû à des polymorphismes, activant ainsi les lymphocytes. Dans les cas de greffes de myoblastes syngéniques effectuées au laboratoire du Dr Tremblay, ces foyers d'infiltrations n'ont pas été observés. Cependant, ce résultat n'exclut

pas la possibilité d'une réactivité spécifique au muscle puisque la présentation antigénique dans un contexte allogénique est différente d'un contexte syngénique. En effet, la présentation peptidique sera différente selon l'affinité du peptide présenté et de la molécule CMH. Dans ce cas, il est possible d'envisager que de nouveaux antigènes spécifiques au muscle présentés par les CMH provenant d'une souris génétiquement différente de la souris mdx, et qui ne seraient pas sélectionnés au thymus, pourraient causer cette activation lymphocytaire. Il serait important de vérifier si une infiltration comparable est aussi observée chez des souris non-dystrophiques (exprimant une dystrophine normale), en utilisant le même protocole de tolérance centrale accompagnée d'une greffe de myoblastes allogéniques. En l'absence de signes d'infiltrations dans ce cas, il serait donc possible de relier la présence de ces cellules infiltrantes à une réactivité contre la dystrophine, absente chez les souris mdx.

La transposition des protocoles présentés dans cette thèse à une application clinique induit plus de questionnements que de réponses. En effet, les études précliniques utilisent des souches de souris congéniques pour permettre une certaine reproductibilité. Le désavantage de l'utilisation de ces souris en transplantation est leur manque de variabilité dans leur répertoire de CMH. Cela a pour effet d'être moins représentatif à l'échelle humaine, où la variabilité génique est beaucoup plus importante. En plus, il a été démontré que le développement de cellules mémoires peut créer une barrière à l'induction de tolérance (Adams et al. 2003). Dans le cas des souris utilisées en laboratoire, leur exposition à des virus, parasites et bactéries est très faible. Leur nombre de lymphocytes mémoires en est donc amoindri, comparé à l'humain, où leur exposition à des agents pathogènes est très grande. Certaines études précliniques d'induction de tolérance ont aussi démontré qu'une infection virale, dont les antigènes viraux produisent une réaction croisée avec les CMH d'un donneur particulier, empêche la survie des greffons (Williams et al. 2001). Ces expériences démontrent que l'induction de tolérance est un phénomène sensible et que plusieurs facteurs peuvent mener à son échec.

Conclusion générale

La transplantation de myoblastes permet d'introduire l'expression de la dystrophine dans les fibres musculaires des patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne. Cette étude avait pour but d'induire un état de tolérance envers la transplantation de myoblastes complètement allogéniques chez la souris.

Plusieurs avenues peuvent être envisagées pour induire un état de tolérance. L'induction de tolérance périphérique a permis la survie à long terme de nombreuses greffes d'organes allogéniques, mais n'a pas permis la survie de greffes de peaux dans la majorité des cas. Notre intérêt s'est donc tourné vers le développement de tolérance par modulation centrale, i.e. développement de chimérisme, où l'acceptation des greffes dans la littérature s'est effectuée dans tous les cas, même chez l'humain. Par contre, l'induction de tolérance centrale doit tendre vers l'utilisation de protocoles les moins toxiques possibles.

En utilisant des protocoles d'induction de tolérance centrale non-myéloablatifs, nous avons démontré la survie à long terme des myoblastes transplantés. Le développement de cette tolérance est robuste et spécifique, démontré par la survie d'une deuxième greffe de myoblastes du même donneur et par le rejet de greffes de peaux provenant d'un donneur non apparenté. La modulation centrale semble être nécessaire au développement de tolérance à des greffes de myoblastes, puisque l'utilisation de protocoles de tolérance périphérique efficaces pour d'autres types de transplantation, sauf la greffe de peau, n'a pas permis la survie à long terme de greffes de myoblastes chez la majorité des souris. La transplantation de myoblastes semble donc être aussi immunogénique que la greffe de peau.

Par contre, l'expression de dystrophine à long terme, dans les cas d'induction de tolérance centrale, est accompagnée dans tous les cas d'une infiltration significative par des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. La raison de la présence de ces lymphocytes reste encore indéterminée, mais pourrait être due à une réaction contre des antigènes spécifiques au muscle, puisque aucune infiltration n'a été observée dans les greffes de peaux qui ont survécu à long terme sur les mêmes souris. Cette évidence exclut la possibilité d'une réactivité des lymphocytes infiltrants contre les CMH du donneur. Étant donné que la

dystrophine est absente des souris *mdx*, il est possible d'envisager une réactivité lymphocytaire contre cette protéine. En plus, les lymphocytes nouvellement formés suite à une greffe de moelle ne seraient pas sélectionnés négativement contre la dystrophine, ce qui causerait une infiltration lymphocytaire dans les muscles. Si l'infiltration lymphocytaire est causée par un antigène spécifique au muscle, cet antigène ne possède pas une grande immunogénicité puisqu'il n'induit pas le rejet à long terme des myoblastes greffés et des fibres musculaires produites par leur fusion, même lors d'une seconde greffe de ces cellules. La cause de cette infiltration lymphocytaire devra être élucidée avant d'envisager une application clinique de développement de tolérance centrale pour la transplantation de myoblastes.

La perspective d'utiliser un protocole d'induction de tolérance centrale par greffe de moelle osseuse cliniquement doit s'accompagner d'une réduction minimale de la toxicité. Nous utilisons présentement une faible dose d'irradiation pan-corporelle de 3 Gy, mais cette dose pourrait être réduite ou remplacée par des drogues cytoréductrices, agissant plus spécifiquement au niveau de la moelle osseuse. Par exemple, l'utilisation du busulfan, ou du threosulfan (encore moins toxique), pourrait éviter l'emploi de l'irradiation. Ces drogues sont présentement sous expérimentation au laboratoire du Dr Tremblay.

En conclusion, nous avons créé un précédent à la transplantation de myoblastes en démontrant la survie à long terme de myoblastes transplantés, sans aucune immunosuppression soutenue. Le modèle de la transplantation de myoblastes comporte plusieurs aspects immunologiques qui méritent d'être approfondis et qui peuvent aider à mieux comprendre l'immunobiologie de la transplantation. Cependant, ce type de transplantation a pour but principal de servir de thérapie à la dystrophie musculaire de Duchenne, et son application sera bientôt démontrée efficace lorsque l'essai clinique en cours, mené par le Dr Tremblay, sera terminé.

Abréviations

AAV : Vecteur viral adéno-associé

ADCC : « Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity »

ADN: Acide désoxyribonucléique

ATP: Adénosine triphosphate

ATPase: Adénosine triphosphatase

β_2 M : β_2 -microglobuline

bFGF: « Basic fibroblast growth factor »

BMT : « Bone marrow transplantation »

CAD: Complexe associé à la dystrophine

CK: Créatine kinase

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA: Cellule présentatrice d'antigène

CTL: Cellule T cytotoxique

DAG : Diacylglycérol

DMD: Dystrophie musculaire de Duchenne

DST: « Donor-specific transfusion »

eGFP: « Enhanced Green Fluorescent Protein »

FGF : « Fibroblast Growth Factor »

GVHD: « Graft-versus-Host Disease »

GITR: « glucocorticoid-induced tumor-necrosis factor receptor »

HLA : « Human leukocyte antigen »

ICAM-1: « Intercellular Adhesion Molecule-1 »

ICOS: « Inducible costimulator »

Ig: Immunoglobuline

IL-1: Interleukine-1

INF: Interféron

IP₃: Inositol triphosphate

ITAM : « Immunoreceptor tyrosine-based activation motif »

Kb: Kilobases

kDa: Kilo Daltons

LAT: « Linker activation in T cell »

LFA-1: « Leukocyte Function-Associated Antigen 1 »

MAST205: « Microtubule associated serine/threonine kinase 205 Kd »

MMP2: « Matrix metalloproteinases 2 »

MT1-MMP: « Membrane type-1 MMP »

NK : « Natural Killer »

NOs: « Nitric oxyde synthase »

nNOs: « Nitric oxyde synthase » de type neuronale

PIP₂ : Phosphatidyl inositol biphosphate

PKC : Protéine kinase C

PLC- γ : Phospholipase C- γ

PTK : Protéine tyrosine kinase

RcB : Récepteur des cellules B

RcT : Récepteur des cellules T

RE: Réticulum endoplasmique

SCID: « Severe combined immunodeficiency »

SCF : « Stem cell factor »

TBI: « Total body irradiation »

T_H : Lymphocyte T $CD4^+$ « Helper »

Treg: Lymphocyte T régulateur

Références bibliographiques

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, et al. (1991). Cellular and molecular immunology. Philadelphia, Saunders.
- Acsadi, G., G. Dickson, et al. (1991). "Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs [see comments]." *Nature* **352**(6338): 815-8.
- Adams, A. B., M. M. Durham, et al. (2001). "Costimulation blockade, busulfan, and bone marrow promote titratable macrochimerism, induce transplantation tolerance, and correct genetic hemoglobinopathies with minimal myelosuppression." *J Immunol* **167**(2): 1103-11.
- Adams, A. B., T. C. Pearson, et al. (2003). "Heterologous immunity: an overlooked barrier to tolerance." *Immunol Rev* **196**: 147-60.
- Ahn, A. H., C. A. Freener, et al. (1996). "The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives." *J Biol Chem* **271**(5): 2724-30.
- Ahn, A. H. et L. M. Kunkel (1993). "The structural and functional diversity of dystrophin." *Nat Genet* **3**(4): 283-91.
- Allsop, K. G. et F. A. Ziter (1981). "Loss of strength and functional decline in Duchenne's dystrophy." *Arch Neurol* **38**(7): 406-11.
- Arahata, K., S. Ishiura, et al. (1988). "Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide." *Nature* **333**(6176): 861-3.
- Arikawa, E., T. Ishihara, et al. (1991). "Immunocytochemical analysis of dystrophin in congenital muscular dystrophy." *J Neurol Sci* **105**(1): 79-87.
- Bach, F. H., R. J. Albertini, et al. (1968). "Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome." *Lancet* **2**(7583): 1364-6.
- Bar, S., E. Barnea, et al. (1990). "A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution." *Biochem J* **272**(2): 557-60.

- Barnea, E., D. Zuk, et al. (1990). "Specificity of expression of the muscle and brain dystrophin gene promoters in muscle and brain cells." *Neuron* **5**(6): 881-8.
- Basadonna, G. P., L. Auersvald, et al. (1998). "Antibody-mediated targeting of CD45 isoforms: a novel immunotherapeutic strategy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(7): 3821-6.
- Battaloglu, E., M. Telatar, et al. (1992). "DNA analysis in Turkish Duchenne/Becker muscular dystrophy families." *Hum Genet* **89**(6): 635-9.
- Baumbach, L. L., J. S. Chamberlain, et al. (1989). "Molecular and clinical correlations of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies." *Neurology* **39**(4): 465-74.
- Beauchamp, J. R., J. E. Morgan, et al. (1999). "Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source." *J Cell Biol* **144**(6): 1113-22.
- Ben Hamida, M., M. Fardeau, et al. (1983). "Severe childhood muscular dystrophy affecting both sexes and frequent in Tunisia." *Muscle Nerve* **6**(7): 469-80.
- Benjamini, E., G. H. Sunshine, et al. (1996). *Immunology : a short course*. New York, Wiley-Liss.
- Bennett, W. M. (1998). "The nephrotoxicity of new and old immunosuppressive drugs." *Ren Fail* **20**(5): 687-90.
- Bertorini, T. E., G. M. Palmieri, et al. (1991). "Effect of dantrolene in Duchenne muscular dystrophy." *Muscle Nerve* **14**(6): 503-7.
- Bies, R. D., C. T. Caskey, et al. (1992). "An intact cysteine-rich domain is required for dystrophin function." *J Clin Invest* **90**(2): 666-72.
- Billingham, R. E., L. Brent, et al. (1953). "Activity acquired tolerance of foreign cells." *Nature* **172**(4379): 603-6.
- Blake, D. J., R. Nawrotzki, et al. (1996). "Isoform diversity of dystrobrevin, the murine 87-kDa postsynaptic protein." *J Biol Chem* **271**(13): 7802-10.
- Bohl, D. et J. M. Heard (1997). "Modulation of erythropoietin delivery from engineered muscles in mice." *Hum Gene Ther* **8**(2): 195-204.

- Bonifati, M. D., G. Ruzza, et al. (2000). "A multicenter, double-blind, randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne muscular dystrophy." *Muscle Nerve* **23**(9): 1344-7.
- Bonilla, E., C. E. Samitt, et al. (1988). "Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface." *Cell* **54**(4): 447-52.
- Boulanger, A., I. Asselin, et al. (1997). "Role of non-major histocompatibility complex antigens in the rejection of transplanted myoblasts." *Transplantation* **63**(6): 893-9.
- Boyce, F. M., A. H. Beggs, et al. (1991). "Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(4): 1276-80.
- Brooke, M. H., R. C. Griggs, et al. (1981). "The natural history of Duchenne muscular dystrophy: a caveat for therapeutic trials." *Trans Am Neurol Assoc* **106**: 195-9.
- Bulman, D. E., S. B. Gangopadhyay, et al. (1991). "Point mutation in the human dystrophin gene: identification through western blot analysis." *Genomics* **10**(2): 457-60.
- Bushby, K. M., D. Gardner-Medwin, et al. (1993). "The clinical, genetic and dystrophin characteristics of Becker muscular dystrophy. II. Correlation of phenotype with genetic and protein abnormalities." *J Neurol* **240**(2): 105-12.
- Byers, T. J., L. M. Kunkel, et al. (1991). "The subcellular distribution of dystrophin in mouse skeletal, cardiac, and smooth muscle." *J Cell Biol* **115**(2): 411-21.
- Byers, T. J., H. G. Lidov, et al. (1993). "An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve." *Nat Genet* **4**(1): 77-81.
- Cao, B., B. Zheng, et al. (2003). "Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential." *Nat Cell Biol* **5**(7): 640-6.
- Carpenter, S., G. Karpati, et al. (1990). "Dystrophin is localized to the plasma membrane of human skeletal muscle fibers by electron-microscopic cytochemical study [see comments]." *Muscle Nerve* **13**(5): 376-80.
- Chai, J. G., I. Bartok, et al. (1999). "Anergic T cells act as suppressor cells in vitro and in vivo." *Eur J Immunol* **29**(2): 686-92.
- Chen, Z., S. Cobbold, et al. (1992). "Tolerance in the mouse to major histocompatibility complex-mismatched heart allografts, and to rat heart xenografts, using monoclonal antibodies to CD4 and CD8." *Eur J Immunol* **22**(3): 805-10.

- Ciubotariu, R., A. I. Colovai, et al. (1998). "Specific suppression of human CD4+ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8+CD28- regulatory T cells." *J Immunol* **161**(10): 5193-202.
- Cobbold, S. P., E. Adams, et al. (1996). "Mechanisms of peripheral tolerance and suppression induced by monoclonal antibodies to CD4 and CD8." *Immunol Rev* **149**: 5-33.
- Cohen, J. L., A. Trenado, et al. (2002). "CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease." *J Exp Med* **196**(3): 401-6.
- Cohen, L., J. Morgan, et al. (1982). "A statistical analysis of the loss of muscle strength in Duchenne's muscular dystrophy." *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **37**(1): 123-38.
- Cooper, B. J. (1989). "Animal models of Duchenne and Becker muscular dystrophy." *Br Med Bull* **45**(3): 703-18.
- Cosimi, A. B. (1995). "Current and future application of monoclonal antibodies in clinical immunosuppressive protocols." *Clin Transplant* **9**(3 Pt 2): 219-26.
- Covone, A. E., F. Caroli, et al. (1992). "Screening Duchenne and Becker muscular dystrophy patients for deletions in 30 exons of the dystrophin gene by three-multiplex PCR [letter]." *Am J Hum Genet* **51**(3): 675-7.
- Cox, G. A., S. F. Phelps, et al. (1993). "New mdx mutation disrupts expression of muscle and nonmuscle isoforms of dystrophin." *Nat Genet* **4**(1): 87-93.
- Crosbie, R. H., J. Heighway, et al. (1997). "Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin- glycoprotein complex." *J Biol Chem* **272**(50): 31221-4.
- Cross, R. A., M. Stewart, et al. (1990). "Structural predictions for the central domain of dystrophin." *FEBS Lett* **262**(1): 87-92.
- Curnow, J., L. Corlett, et al. (2001). "Presentation by myoblasts of an epitope from endogenous acetylcholine receptor indicates a potential role in the spreading of the immune response." *J Neuroimmunol* **115**(1-2): 127-34.
- Dai, Z., B. T. Konieczny, et al. (1998). "Impaired alloantigen-mediated T cell apoptosis and failure to induce long-term allograft survival in IL-2-deficient mice." *J Immunol* **161**(4): 1659-63.

- Day, C. S., C. Kasemkijwattana, et al. (1997). "Myoblast-mediated gene transfer to the joint." *J Orthop Res* **15**(6): 894-903.
- de Vries-van der Zwan, A., A. C. Besseling, et al. (1997). "Specific tolerance induction and transplantation: a single-day protocol." *Blood* **89**(7): 2596-601.
- de Vries-van der Zwan, A., M. A. van der Pol, et al. (1998). "An alternative conditioning regimen for induction of specific skin graft tolerance across full major histocompatibility complex barriers." *Transpl Immunol* **6**(3): 147-51.
- Deglon, N., B. Heyd, et al. (1996). "Central nervous system delivery of recombinant ciliary neurotrophic factor by polymer encapsulated differentiated C2C12 myoblasts." *Hum Gene Ther* **7**(17): 2135-46.
- Den Dunnen, J. T., P. M. Grootsholten, et al. (1989). "Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications." *Am J Hum Genet* **45**(6): 835-47.
- Dengler, T. J., G. Szabo, et al. (1999). "Prolonged allograft survival but no tolerance induction by modulating CD28 antibody JJ319 after high-responder rat heart transplantation." *Transplantation* **67**(3): 392-8.
- Dhawan, J., L. C. Pan, et al. (1991). "Systemic delivery of human growth hormone by injection of genetically engineered myoblasts." *Science* **254**(5037): 1509-12.
- Dhawan, J., T. A. Rando, et al. (1996). "Myoblast-mediated expression of colony stimulating factor-1 (CSF-1) in the cytokine-deficient op/op mouse." *Somat Cell Mol Genet* **22**(5): 363-81.
- Dick, D. J., D. Gardner-Medwin, et al. (1986). "A trial of flunarizine in the treatment of Duchenne muscular dystrophy." *Muscle Nerve* **9**(4): 349-54.
- DiMario, J., N. Buffinger, et al. (1989). "Fibroblast growth factor in the extracellular matrix of dystrophic (mdx) mouse muscle." *Science* **244**(4905): 688-90.
- Dong, V. M., K. L. Womer, et al. (1999). "Transplantation tolerance: the concept and its applicability." *Pediatr Transplant* **3**(3): 181-92.
- Duchenne, G. B. (1861). *De l'électrisation localisée et de son application à la pathologie et à la thérapeutique*. Paris,, J.-B. Baillièrre et fils; etc. etc.
- Duchenne, G. B. A. (1868). *De la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ou paralysie myo-sclérosique*. Paris,, P. Asselin.

- Durbeej, M., D. Jung, et al. (1997). "Transient expression of Dp140, a product of the Duchenne muscular dystrophy locus, during kidney tubulogenesis." *Dev Biol* **181**(2): 156-67.
- Durham, M. M., A. W. Bingaman, et al. (2000). "Cutting edge: administration of anti-CD40 ligand and donor bone marrow leads to hemopoietic chimerism and donor-specific tolerance without cytoreductive conditioning." *J Immunol* **165**(1): 1-4.
- Ehmsen, J., E. Poon, et al. (2002). "The dystrophin-associated protein complex." *J Cell Sci* **115**(Pt 14): 2801-3.
- Ehrig, K., I. Leivo, et al. (1990). "Merosin, a tissue-specific basement membrane protein, is a laminin-like protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(9): 3264-8.
- Eiholzer, U., E. Boltshauser, et al. (1988). "Short stature: a common feature in Duchenne muscular dystrophy." *Eur J Pediatr* **147**(6): 602-5.
- El Fahime, E., Y. Torrente, et al. (2000). "In vivo migration of transplanted myoblasts requires matrix metalloproteinase activity." *Exp Cell Res* **258**(2): 279-87.
- Elwood, E. T., C. P. Larsen, et al. (1997). "Microchimerism and rejection in clinical transplantation." *Lancet* **349**(9062): 1358-60.
- Emery, A. E. (1980). "Duchenne muscular dystrophy. Genetic aspects, carrier detection and antenatal diagnosis." *Br Med Bull* **36**(2): 117-22.
- Emery, A. E. H. (1993). *Duchenne muscular dystrophy*. New York, Oxford University Press.
- Engel, A. et C. Franzini-Armstrong (1994). *Myology : basic and clinical*. New York, McGraw-Hill.
- Ennis, B. W. et L. M. Matrisian (1994). "Matrix degrading metalloproteinases." *J Neurooncol* **18**(2): 105-9.
- Ervasti, J. M. et K. P. Campbell (1993). "A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin." *J Cell Biol* **122**(4): 809-23.
- Ervasti, J. M., K. Ohlendieck, et al. (1990). "Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle." *Nature* **345**(6273): 315-9.
- Farber, J. L. (1982). "Biology of disease: membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis." *Lab Invest* **47**(2): 114-23.

- Fecteau, S., G. P. Basadonna, et al. (2001). "CTLA-4 up-regulation plays a role in tolerance mediated by CD45." *Nat Immunol* **2**(1): 58-63.
- Fenichel, G. M., J. M. Florence, et al. (1991a). "Long-term benefit from prednisone therapy in Duchenne muscular dystrophy." *Neurology* **41**(12): 1874-7.
- Fenichel, G. M., J. R. Mendell, et al. (1991b). "A comparison of daily and alternate-day prednisone therapy in the treatment of Duchenne muscular dystrophy." *Arch Neurol* **48**(6): 575-9.
- Ferrari, G., G. Cusella-De Angelis, et al. (1998). "Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors." *Science* **279**(5356): 1528-30.
- Firth, M., D. Gardner-Medwin, et al. (1983). "Interviews with parents of boys suffering from Duchenne muscular dystrophy." *Dev Med Child Neurol* **25**(4): 466-71.
- Florence, J. M., P. T. Fox, et al. (1985). "Activity, creatine kinase, and myoglobin in Duchenne muscular dystrophy: a clue to etiology?" *Neurology* **35**(5): 758-61.
- Floyd, S. S., P. R. Clemens, et al. (1998). "Ex vivo gene transfer using adenovirus-mediated full-length dystrophin delivery to dystrophic muscles." *Gene Ther* **5**(1): 19-30.
- Francois Bach, J. (2003). "Regulatory T cells under scrutiny." *Nat Rev Immunol* **3**(3): 189-98.
- Fuchimoto, Y., C. A. Huang, et al. (2000). "Mixed chimerism and tolerance without whole body irradiation in a large animal model." *J Clin Invest* **105**(12): 1779-89.
- Galbiati, F., B. Razani, et al. (2001). "Caveolae and caveolin-3 in muscular dystrophy." *Trends Mol Med* **7**(10): 435-41.
- Gardner-Medwin, D. (1970). "Mutation rate in Duchenne type of muscular dystrophy." *J Med Genet* **7**(4): 334-7.
- Gardner-Medwin, D. (1980). "Clinical features and classification of the muscular dystrophies." *Br Med Bull* **36**(2): 109-15.
- Garlepp, M. J., W. Chen, et al. (1995). "Antigen processing and presentation by a murine myoblast cell line." *Clin Exp Immunol* **102**(3): 614-9.
- Gaschen, F. P., E. P. Hoffman, et al. (1992). "Dystrophin deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats." *J Neurol Sci* **110**(1-2): 149-59.
- Gilliet, M. et Y. J. Liu (2002). "Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells." *J Exp Med* **195**(6): 695-704.

- Goebels, N., D. Michaelis, et al. (1992). "Human myoblasts as antigen-presenting cells." *J Immunol* **149**(2): 661-7.
- Goldsby, R. A., T. J. Kindt, et al. (2000). *Kuby immunology*. New York, W.H. Freeman.
- Gomez, M. R., A. G. Engel, et al. (1977). "Failure of inactivation of Duchenne dystrophy X-chromosome in one of female identical twins." *Neurology* **27**(6): 537-41.
- Gorecki, D. C., A. P. Monaco, et al. (1992). "Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters." *Hum Mol Genet* **1**(7): 505-10.
- Gowers, W. R. (1886). *A manual of diseases of the nervous system*. London,, Churchill.
- Graca, L., S. P. Cobbold, et al. (2002). "Identification of regulatory T cells in tolerated allografts." *J Exp Med* **195**(12): 1641-6.
- Greenstein, R. M., M. P. Reardon, et al. (1980). "An (X;11) translocation in a girl with Duchenne muscular dystrophy. Repository identification No. GM1695." *Cytogenet Cell Genet* **27**(4): 268.
- Greenwald, R. J., V. A. Boussiotis, et al. (2001). "CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo." *Immunity* **14**(2): 145-55.
- Grounds, M. D. et J. K. McGeachie (1992). "Skeletal muscle regeneration after crush injury in dystrophic mdx mice: an autoradiographic study." *Muscle Nerve* **15**(5): 580-6.
- Grozdanovic, Z. et H. G. Baumgarten (1999). "Nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: a signaling component of the dystrophin-glycoprotein complex." *Histol Histopathol* **14**(1): 243-56.
- Guerette, B., I. Asselin, et al. (1997a). "Control of inflammatory damage by anti-LFA-1: increase success of myoblast transplantation." *Cell Transplant* **6**(2): 101-7.
- Guerette, B., I. Asselin, et al. (1995a). "Lymphocyte infiltration following allo- and xenomyoblast transplantation in mdx mice." *Muscle Nerve* **18**(1): 39-51.
- Guerette, B., R. Roy, et al. (1995b). "Increased granzyme B mRNA after alloincompatible myoblast transplantation." *Transplantation* **60**(9): 1011-6.
- Guerette, B., D. Skuk, et al. (1997b). "Prevention by anti-LFA-1 of acute myoblast death following transplantation." *J Immunol* **159**(5): 2522-31.

- Guerette, B., G. Tremblay, et al. (1996). "Increased interferon-gamma mRNA expression following alloincompatible myoblast transplantation is inhibited by FK506." *Muscle Nerve* **19**(7): 829-35.
- Gussoni, E., R. R. Bennett, et al. (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, et al. (1992). "Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation." *Nature* **356**(6368): 435-8.
- Gussoni, E., Y. Soneoka, et al. (1999). "Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation." *Nature* **401**(6751): 390-4.
- Hagege, A. A., C. Carrion, et al. (2003). "Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischaemic cardiomyopathy." *Lancet* **361**(9356): 491-2.
- Hall, B. M., N. W. Pearce, et al. (1990). "Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. III. Further characterization of the CD4+ suppressor cell and its mechanisms of action." *J Exp Med* **171**(1): 141-57.
- Hamamori, Y., B. Samal, et al. (1994). "Persistent erythropoiesis by myoblast transfer of erythropoietin cDNA." *Hum Gene Ther* **5**(11): 1349-56.
- Hamamori, Y., B. Samal, et al. (1995). "Myoblast transfer of human erythropoietin gene in a mouse model of renal failure." *J Clin Invest* **95**(4): 1808-13.
- Hammonds, R. G., Jr. (1987). "Protein sequence of DMD gene is related to actin-binding domain of alpha-actinin [letter]." *Cell* **51**(1): 1.
- Hancock, W. W., M. H. Sayegh, et al. (1996). "Costimulatory function and expression of CD40 ligand, CD80, and CD86 in vascularized murine cardiac allograft rejection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(24): 13967-72.
- Hara, M., C. I. Kingsley, et al. (2001). "IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo." *J Immunol* **166**(6): 3789-96.
- Hartigan-O'Connor, D. et J. S. Chamberlain (2000). "Developments in gene therapy for muscular dystrophy." *Microsc Res Tech* **48**(3-4): 223-38.

- Haynes, B. F., M. L. Markert, et al. (2000). "The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection." *Annu Rev Immunol* **18**: 529-60.
- Hayry, P., H. Isoniemi, et al. (1993). "Chronic allograft rejection." *Immunol Rev* **134**: 33-81.
- Helg, C., B. Chapuis, et al. (1994). "Renal transplantation without immunosuppression in a host with tolerance induced by allogeneic bone marrow transplantation." *Transplantation* **58**(12): 1420-2.
- Hemmings, L., P. A. Kuhlman, et al. (1992). "Analysis of the actin-binding domain of alpha-actinin by mutagenesis and demonstration that dystrophin contains a functionally homologous domain." *J Cell Biol* **116**(6): 1369-80.
- Herbelin, A., J. M. Gombert, et al. (1998). "Mature mainstream TCR alpha beta+CD4+ thymocytes expressing L-selectin mediate "active tolerance" in the nonobese diabetic mouse." *J Immunol* **161**(5): 2620-8.
- Hiraishi, Y., S. Kato, et al. (1992). "Quantitative Southern blot analysis in the dystrophin gene of Japanese patients with Duchenne or Becker muscular dystrophy: a high frequency of duplications." *J Med Genet* **29**(12): 897-901.
- Hoffman, E. P., R. H. Brown, Jr., et al. (1987). "Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus." *Cell* **51**(6): 919-28.
- Hoffmann, P., J. Ermann, et al. (2002). "Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation." *J Exp Med* **196**(3): 389-99.
- Hori, S., T. Nomura, et al. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." *Science* **299**(5609): 1057-61.
- Hu, X. Y., P. N. Ray, et al. (1990). "Duplicational mutation at the Duchenne muscular dystrophy locus: its frequency, distribution, origin, and phenotype/genotype correlation." *Am J Hum Genet* **46**(4): 682-95.
- Huard, J., R. Roy, et al. (1992). "Human myoblast transplantation between immunohistocompatible donors and recipients produces immune reactions." *Transplant Proc* **24**(6): 3049-51.

- Huard, J., R. Roy, et al. (1994a). "Human myoblast transplantation in immunodeficient and immunosuppressed mice: evidence of rejection." *Muscle Nerve* **17**(2): 224-34.
- Huard, J., S. Verreault, et al. (1994b). "High efficiency of muscle regeneration after human myoblast clone transplantation in SCID mice." *J Clin Invest* **93**(2): 586-99.
- Hugnot, J. P., H. Gilgenkrantz, et al. (1992). "Distal transcript of the dystrophin gene initiated from an alternative first exon and encoding a 75-kDa protein widely distributed in nonmuscle tissues." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(16): 7506-10.
- Hutchinson, I. V. (1986). "Suppressor T cells in allogeneic models." *Transplantation* **41**(5): 547-55.
- Ibraghimov-Beskrovnaya, O., J. M. Ervasti, et al. (1992). "Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix." *Nature* **355**(6362): 696-702.
- Ildstad, S. T. et D. H. Sachs (1984). "Reconstitution with syngeneic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts or xenografts." *Nature* **307**(5947): 168-70.
- Ildstad, S. T., S. M. Wren, et al. (1986). "Effect of selective T cell depletion of host and/or donor bone marrow on lymphopoietic repopulation, tolerance, and graft-vs-host disease in mixed allogeneic chimeras (B10 + B10.D2----B10)." *J Immunol* **136**(1): 28-33.
- Irintchev, A., M. Zweyer, et al. (1995). "Cellular and molecular reactions in mouse muscles after myoblast implantation." *J Neurocytol* **24**(4): 319-31.
- Ito, H., P. L. Hallauer, et al. (1998a). "Prior culture with concanavalin A increases intramuscular migration of transplanted myoblast." *Muscle Nerve* **21**(3): 291-7.
- Ito, H., J. Kurtz, et al. (2001). "CD4 T cell-mediated alloresistance to fully MHC-mismatched allogeneic bone marrow engraftment is dependent on CD40-CD40 ligand interactions, and lasting T cell tolerance is induced by bone marrow transplantation with initial blockade of this pathway." *J Immunol* **166**(5): 2970-81.
- Ito, H., J. T. Vilquin, et al. (1998b). "Myoblast transplantation in non-dystrophic dog." *Neuromuscul Disord* **8**(2): 95-110.
- Iwakoshi, N. N., J. P. Mordes, et al. (2000). "Treatment of allograft recipients with donor-specific transfusion and anti-CD154 antibody leads to deletion of alloreactive CD8+

- T cells and prolonged graft survival in a CTLA4-dependent manner [In Process Citation]." *J Immunol* **164**(1): 512-21.
- Jackson, K. A., T. Mi, et al. (1999). "Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle [see comments]." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25): 14482-6.
- Jackson, M. J., D. A. Jones, et al. (1984). "Experimental skeletal muscle damage: the nature of the calcium- activated degenerative processes." *Eur J Clin Invest* **14**(5): 369-74.
- Jackson, M. J., D. A. Jones, et al. (1985). "Measurements of calcium and other elements in muscle biopsy samples from patients with Duchenne muscular dystrophy." *Clin Chim Acta* **147**(3): 215-21.
- Jacobs, P. A., P. A. Hunt, et al. (1981). "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* **33**(4): 513-8.
- Jacobsen, N., E. Taaning, et al. (1994). "Tolerance to an HLA-B,DR disparate kidney allograft after bone-marrow transplantation from same donor [letter]." *Lancet* **343**(8900): 800.
- Janeway, C., P. Travers, et al. (2001). *Immunobiology 5 : the immune system in health and disease*. New York, Garland Pub.
- Jones, D. A., M. J. Jackson, et al. (1984). "Experimental mouse muscle damage: the importance of external calcium." *Clin Sci* **66**(3): 317-22.
- Jones, N. D., N. C. Fluck, et al. (1998). "The induction of transplantation tolerance by intrathymic (i.t.) delivery of alloantigen: a critical relationship between i.t. deletion, thymic export of new T cells and the timing of transplantation." *Int Immunol* **10**(11): 1637-46.
- Jones, N. D., N. C. Fluck, et al. (1997). "Deletion of alloantigen-reactive thymocytes as a mechanism of adult tolerance induction following intrathymic antigen administration." *Eur J Immunol* **27**(7): 1591-600.
- Jones, N. D., A. Van Maurik, et al. (2000). "CD40-CD40 ligand-independent activation of CD8+ T cells can trigger allograft rejection." *J Immunol* **165**(2): 1111-8.
- Josien, R., P. Douillard, et al. (1998). "A critical role for transforming growth factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance." *J Clin Invest* **102**(11): 1920-6.

- Jung, D., B. Yang, et al. (1995). "Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan." *J Biol Chem* **270**(45): 27305-10.
- Kaminski, H. J., M. al-Hakim, et al. (1992). "Extraocular muscles are spared in advanced Duchenne dystrophy." *Ann Neurol* **32**(4): 586-8.
- Kar, N. C. et C. M. Pearson (1978). "Muscular dystrophy and activation of proteinases." *Muscle Nerve* **1**(4): 308-13.
- Karpati, G., D. Ajdukovic, et al. (1993). "Myoblast transfer in Duchenne muscular dystrophy." *Ann Neurol* **34**(1): 8-17.
- Karpati, G., Y. Pouliot, et al. (1989). "Dystrophin is expressed in mdx skeletal muscle fibers after normal myoblast implantation." *Am J Pathol* **135**(1): 27-32.
- Kawai, T., D. Andrews, et al. (2000). "Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand." *Nat Med* **6**(2): 114.
- Kawai, T., A. B. Cosimi, et al. (1995). "Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys." *Transplantation* **59**(2): 256-62.
- Kawai, T., A. B. Cosimi, et al. (2002). "Effect of mixed hematopoietic chimerism on cardiac allograft survival in cynomolgus monkeys." *Transplantation* **73**(11): 1757-64.
- Kearney, E. R., K. A. Pape, et al. (1994). "Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo." *Immunity* **1**(4): 327-39.
- Kenyon, N. S., M. Chatzipetrou, et al. (1999). "Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(14): 8132-7.
- Kilimann, M. W., A. Pizzuti, et al. (1992). "Point mutations and polymorphisms in the human dystrophin gene identified in genomic DNA sequences amplified by multiplex PCR." *Hum Genet* **89**(3): 253-8.
- Kimikawa, M., D. H. Sachs, et al. (1997). "Modifications of the conditioning regimen for achieving mixed chimerism and donor-specific tolerance in cynomolgus monkeys." *Transplantation* **64**(5): 709-16.
- Kingsley, C. I., M. Karim, et al. (2002). "CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses." *J Immunol* **168**(3): 1080-6.

- Kinoshita, I., R. Roy, et al. (1996). "Myoblast transplantation in monkeys: control of immune response by FK506." *J Neuropathol Exp Neurol* **55**(6): 687-97.
- Kinoshita, I., J. T. Vilquin, et al. (1995a). "Myoblast allotransplantation in primates [letter]." *Muscle Nerve* **18**(10): 1217-8.
- Kinoshita, I., J. T. Vilquin, et al. (1994). "Very efficient myoblast allotransplantation in mice under FK506 immunosuppression." *Muscle Nerve* **17**(12): 1407-15.
- Kinoshita, I., J. T. Vilquin, et al. (1995b). "Pretreatment of myoblast cultures with basic fibroblast growth factor increases the efficacy of their transplantation in mdx mice." *Muscle Nerve* **18**(8): 834-41.
- Kirk, A. D., L. C. Burkly, et al. (1999). "Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates." *Nat Med* **5**(6): 686-93.
- Kirk, A. D., D. M. Harlan, et al. (1997). "CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(16): 8789-94.
- Klamut, H. J., E. E. Zubrzycka-Gaarn, et al. (1989). "Myogenic regulation of dystrophin gene expression." *Br Med Bull* **45**(3): 681-702.
- Klintmalm, G. B. et T. A. Gonwa (1995). "Nephrotoxicity associated with cyclosporine and FK506." *Liver Transpl Surg* **1**(5 Suppl 1): 11-9.
- Kobzik, L., M. B. Reid, et al. (1994). "Nitric oxide in skeletal muscle [see comments]." *Nature* **372**(6506): 546-8.
- Koenig, M., A. H. Beggs, et al. (1989). "The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion." *Am J Hum Genet* **45**(4): 498-506.
- Koenig, M., E. P. Hoffman, et al. (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.
- Koenig, M., A. P. Monaco, et al. (1988). "The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein." *Cell* **53**(2): 219-26.
- Koh, G. Y., M. G. Klug, et al. (1993). "Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart." *J Clin Invest* **92**(3): 1548-54.

- Kornegay, J. N., N. J. Sharp, et al. (1990). "Golden retriever muscular dystrophy: monitoring for success." *Adv Exp Med Biol* **280**: 267-72.
- Kosuge, H., J. Suzuki, et al. (2003). "Induction of immunologic tolerance to cardiac allograft by simultaneous blockade of inducible co-stimulator and cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 pathway." *Transplantation* **75**(8): 1374-9.
- Kurtz, J., H. Ito, et al. (2001). "Mechanisms involved in the establishment of tolerance through costimulatory blockade and BMT: lack of requirement for CD40L-mediated signaling for tolerance or deletion of donor-reactive CD4+ cells." *Am J Transplant* **1**(4): 339-49.
- Labrecque, C., J. P. Bouchard, et al. (1991). "Approche thérapeutique de la dystrophie musculaire de Duchenne par transplantation de myoblastes." *Medecine Science* **7**: 821-829.
- Labrecque, C., R. Roy, et al. (1992). "Immune reactions after myoblast transplantation in mouse muscles." *Transplant Proc* **24**(6): 2889-92.
- Lakkis, F. G., A. Arakelov, et al. (2000). "Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue." *Nat Med* **6**(6): 686-8.
- Larsen, C. P., D. Z. Alexander, et al. (1996a). "CD40-gp39 interactions play a critical role during allograft rejection. Suppression of allograft rejection by blockade of the CD40-gp39 pathway." *Transplantation* **61**(1): 4-9.
- Larsen, C. P., E. T. Elwood, et al. (1996b). "Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways." *Nature* **381**(6581): 434-8.
- Law, P. K., T. G. Goodwin, et al. (1992). "Feasibility, safety, and efficacy of myoblast transfer therapy on Duchenne muscular dystrophy boys." *Cell Transplant* **1**(2-3): 235-44.
- Lazarovits, A. I., S. Poppema, et al. (1996). "Prevention and reversal of renal allograft rejection by antibody against CD45RB." *Nature* **380**(6576): 717-20.
- Lechler, R., J. G. Chai, et al. (2001). "The contributions of T-cell anergy to peripheral T-cell tolerance." *Immunology* **103**(3): 262-9.
- Lederfein, D., Z. Levy, et al. (1992). "A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(12): 5346-50.

- Leivo, I. et E. Engvall (1988). "Merosin, a protein specific for basement membranes of Schwann cells, striated muscle, and trophoblast, is expressed late in nerve and muscle development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(5): 1544-8.
- Lemaire, C., R. Heilig, et al. (1988). "The chicken dystrophin cDNA: striking conservation of the C-terminal coding and 3' untranslated regions between man and chicken." *Embo J* **7**(13): 4157-62.
- Lenschow, D. J., Y. Zeng, et al. (1992). "Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4Ig." *Science* **257**(5071): 789-92.
- Lev, A. A., C. C. Feener, et al. (1987). "Expression of the Duchenne's muscular dystrophy gene in cultured muscle cells." *J Biol Chem* **262**(33): 15817-20.
- Levine, B. A., A. J. Moir, et al. (1990). "The interaction of actin with dystrophin." *FEBS Lett* **263**(1): 159-62.
- Levings, M. K., R. Sangregorio, et al. (2001). "Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function." *J Exp Med* **193**(11): 1295-302.
- Levisetti, M. G., P. A. Padrid, et al. (1997). "Immunosuppressive effects of human CTLA4Ig in a non-human primate model of allogeneic pancreatic islet transplantation." *J Immunol* **159**(11): 5187-91.
- Li, Y., X. C. Li, et al. (1999). "Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance." *Nat Med* **5**(11): 1298-302.
- Lin, H., S. F. Bolling, et al. (1993). "Long-term acceptance of major histocompatibility complex mismatched cardiac allografts induced by CTLA4Ig plus donor-specific transfusion." *J Exp Med* **178**(5): 1801-6.
- Lindenbaum, R. H., G. Clarke, et al. (1979). "Muscular dystrophy in an X; 1 translocation female suggests that Duchenne locus is on X chromosome short arm." *J Med Genet* **16**(5): 389-92.
- Little, W. J. (1853). *On the nature and treatment of the deformities of the human frame: being a course of lectures delivered at the Royal Orthopaedic Hospital in 1843, with numerous notes and additions to the present time.* London,, Longman Brown Green and Longmans.

- Love, D. R., B. C. Byth, et al. (1993). "Dystrophin and dystrophin-related proteins: a review of protein and RNA studies." *Neuromuscul Disord* **3**(1): 5-21.
- Love, D. R., D. F. Hill, et al. (1989). "An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin." *Nature* **339**(6219): 55-8.
- Lu, L., W. Li, et al. (1997). "Blockade of the CD40-CD40 ligand pathway potentiates the capacity of donor-derived dendritic cell progenitors to induce long-term cardiac allograft survival." *Transplantation* **64**(12): 1808-15.
- Lumeng, C., S. Phelps, et al. (1999). "Interactions between beta 2-syntrophin and a family of microtubule-associated serine/threonine kinases." *Nat Neurosci* **2**(7): 611-7.
- Main, J. M. et R. T. Prehn (1955). "Successful skin homografts after the administration of high dosage X radiation and homologous bone marrow." *J Natl Cancer Inst* **15**(4): 1023-9.
- Markees, T. G., N. E. Phillips, et al. (1998). "Long-term survival of skin allografts induced by donor splenocytes and anti-CD154 antibody in thymectomized mice requires CD4(+) T cells, interferon-gamma, and CTLA4." *J Clin Invest* **101**(11): 2446-55.
- Markees, T. G., N. E. Phillips, et al. (1997). "Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand." *Transplantation* **64**(2): 329-35.
- Markmann, J. F., J. S. Odorico, et al. (1993). "Deletion of donor-reactive T lymphocytes in adult mice after intrathymic inoculation with lymphoid cells." *Transplantation* **55**(4): 871-6; discussion 876-7.
- Matsumura, K., F. M. Tome, et al. (1992). "Deficiency of the 50K dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy." *Nature* **359**(6393): 320-2.
- Matsumura, K., F. M. Tome, et al. (1993). "Deficiency of dystrophin-associated proteins in Duchenne muscular dystrophy patients lacking COOH-terminal domains of dystrophin." *J Clin Invest* **92**(2): 866-71.
- Matsuo, M., T. Masumura, et al. (1991). "Exon skipping during splicing of dystrophin mRNA precursor due to an intraexon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy kobe." *J Clin Invest* **87**(6): 2127-31.

- Mayumi, H. et R. A. Good (1989). "Long-lasting skin allograft tolerance in adult mice induced across fully allogeneic (multimajor H-2 plus multimajor histocompatibility) antigen barriers by a tolerance-inducing method using cyclophosphamide." *J Exp Med* **169**(1): 213-38.
- McCauley, J. (1993). "The nephrotoxicity of FK506 as compared with cyclosporine." *Curr Opin Nephrol Hypertens* **2**(4): 662-9.
- Mendell, J. R., J. T. Kissel, et al. (1995). "Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy." *N Engl J Med* **333**(13): 832-8.
- Mendell, J. R., R. T. Moxley, et al. (1989). "Randomized, double-blind six-month trial of prednisone in Duchenne's muscular dystrophy." *N Engl J Med* **320**(24): 1592-7.
- Merly, F., C. Huard, et al. (1998). "Anti-inflammatory effect of transforming growth factor-beta1 in myoblast transplantation." *Transplantation* **65**(6): 793-9.
- Metzinger, L., D. J. Blake, et al. (1997). "Dystrobrevin deficiency at the sarcolemma of patients with muscular dystrophy." *Hum Mol Genet* **6**(7): 1185-91.
- Moisset, P. A., L. Bonham, et al. (2000). "Systemic production of human granulocyte colony-stimulating factor in nonhuman primates by transplantation of genetically modified myoblasts." *Hum Gene Ther* **11**(9): 1277-88.
- Moisset, P. A., D. Skuk, et al. (1998). "Successful transplantation of genetically corrected DMD myoblasts following ex vivo transduction with the dystrophin minigene." *Biochem Biophys Res Commun* **247**(1): 94-9.
- Mokri, B. et A. G. Engel (1975). "Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber." *Neurology* **25**(12): 1111-20.
- Monaco, A. P., C. J. Bertelson, et al. (1988). "An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus." *Genomics* **2**(1): 90-5.
- Monaco, A. P., R. L. Neve, et al. (1986). "Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene." *Nature* **323**(6089): 646-50.
- Morgan, J. E., C. N. Pagel, et al. (1993). "Long-term persistence and migration of myogenic cells injected into pre-irradiated muscles of mdx mice." *J Neurol Sci* **115**(2): 191-200.

- Moser, H. (1984). "Duchenne muscular dystrophy: pathogenetic aspects and genetic prevention." *Hum Genet* **66**(1): 17-40.
- Mostacciuolo, M. L., A. Lombardi, et al. (1987). "Population data on benign and severe forms of X-linked muscular dystrophy." *Hum Genet* **75**(3): 217-20.
- Moxley, R. T., 3rd, M. H. Brooke, et al. (1987). "Clinical investigation in Duchenne dystrophy. VI. Double-blind controlled trial of nifedipine." *Muscle Nerve* **10**(1): 22-33.
- Mukoyama, M., K. Kondo, et al. (1987). "Life spans of Duchenne muscular dystrophy patients in the hospital care program in Japan." *J Neurol Sci* **81**(2-3): 155-8.
- Muntoni, F., S. Torelli, et al. (2003). "Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes." *Lancet Neurol* **2**(12): 731-40.
- Murry, C. E., R. W. Wiseman, et al. (1996). "Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis." *J Clin Invest* **98**(11): 2512-23.
- Neu, A. M., S. L. Furth, et al. (1997). "Evaluation of neurotoxicity in pediatric renal transplant recipients treated with tacrolimus (FK506)." *Clin Transplant* **11**(5 Pt 1): 412-4.
- Newell, K. A., G. He, et al. (1999). "Cutting edge: blockade of the CD28/B7 costimulatory pathway inhibits intestinal allograft rejection mediated by CD4+ but not CD8+ T cells." *J Immunol* **163**(5): 2358-62.
- Newey, S. E., E. V. Howman, et al. (2001). "Syncoilin, a novel member of the intermediate filament superfamily that interacts with alpha-dystrobrevin in skeletal muscle." *J Biol Chem* **276**(9): 6645-55.
- Nicholson, L. V., K. Davison, et al. (1989). "Dystrophin in skeletal muscle. I. Western blot analysis using a monoclonal antibody." *J Neurol Sci* **94**(1-3): 125-36.
- Niemann-Seyde, S., R. Slomski, et al. (1992). "Molecular genetic analysis of 67 patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy." *Hum Genet* **90**(1-2): 65-70.
- Noelle, R. J. (1996). "CD40 and its ligand in host defense." *Immunity* **4**(5): 415-9.
- North, A. J., B. Galazkiewicz, et al. (1993). "Complementary distributions of vinculin and dystrophin define two distinct sarcolemma domains in smooth muscle." *J Cell Biol* **120**(5): 1159-67.

- Nudel, U., K. Robzyk, et al. (1988). "Expression of the putative Duchenne muscular dystrophy gene in differentiated myogenic cell cultures and in the brain." *Nature* **331**(6157): 635-8.
- Nudel, U., D. Zuk, et al. (1989). "Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain." *Nature* **337**(6202): 76-8.
- Ohlendieck, K. et K. P. Campbell (1991). "Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from mdx mice." *J Cell Biol* **115**(6): 1685-94.
- Ohlendieck, K., K. Matsumura, et al. (1993). "Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin-associated proteins in the sarcolemma." *Neurology* **43**(4): 795-800.
- Ohtsuka, Y., K. Udaka, et al. (1998). "Dystrophin acts as a transplantation rejection antigen in dystrophin-deficient mice: implication for gene therapy." *J Immunol* **160**(9): 4635-40.
- Omoto, K., Y. Nishimura, et al. (1996). "Anti-CD4 monoclonal antibody reduces the dose of cyclophosphamide required to induce tolerance to H-2 haplotype identical skin allografts in mice." *Immunobiology* **195**(1): 16-32.
- Ozawa, E., S. Noguchi, et al. (1998). "From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy: evolution of a concept of muscular dystrophy." *Muscle Nerve* **21**(4): 421-38.
- Ozawa, E., M. Yoshida, et al. (1995). "Dystrophin-associated proteins in muscular dystrophy." *Hum Mol Genet* **4 Spec No**: 1711-6.
- Ozkaynak, E., W. Gao, et al. (2001). "Importance of ICOS-B7RP-1 costimulation in acute and chronic allograft rejection." *Nat Immunol* **2**(7): 591-6.
- Pagani, F. D., H. DerSimonian, et al. (2003). "Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation." *J Am Coll Cardiol* **41**(5): 879-88.
- Pan, Y., B. Luo, et al. (2003). "Blockade of the CD40/CD154 pathway enhances T-cell-depleted allogeneic bone marrow engraftment under nonmyeloablative and irradiation-free conditioning therapy." *Transplantation* **76**(1): 216-24.
- Parker, D. C., D. L. Greiner, et al. (1995). "Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(21): 9560-4.

- Partridge, T. A., J. E. Morgan, et al. (1989). "Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts." *Nature* **337**(6203): 176-9.
- Pearson, T. C., J. C. Madsen, et al. (1992). "Induction of transplantation tolerance in adults using donor antigen and anti-CD4 monoclonal antibody." *Transplantation* **54**(3): 475-83.
- Pelot, M. R., D. A. Pearson, et al. (1999). "Lymphohematopoietic graft-vs.-host reactions can be induced without graft-vs.-host disease in murine mixed chimeras established with a cyclophosphamide-based nonmyeloablative conditioning regimen." *Biol Blood Marrow Transplant* **5**(3): 133-43.
- Pernice, W., R. Beckmann, et al. (1988). "A double-blind placebo controlled trial of diltiazem in Duchenne dystrophy." *Klin Wochenschr* **66**(13): 565-70.
- Peters, M. F., M. E. Adams, et al. (1997). "Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex." *J Cell Biol* **138**(1): 81-93.
- Peters, M. F., N. R. Kramarcy, et al. (1994). "beta 2-Syntrophin: localization at the neuromuscular junction in skeletal muscle." *Neuroreport* **5**(13): 1577-80.
- Philip, A. T. et B. Gerson (1998). "Toxicology and adverse effects of drugs used for immunosuppression in organ transplantation." *Clin Lab Med* **18**(4): 755-65.
- Poon, E., E. V. Howman, et al. (2002). "Association of syncoilin and desmin: linking intermediate filament proteins to the dystrophin-associated protein complex." *J Biol Chem* **277**(5): 3433-9.
- Prelle, A., R. Medori, et al. (1992). "Dystrophin deficiency in a case of congenital myopathy." *J Neurol* **239**(2): 76-8.
- Prior, T. W., A. C. Papp, et al. (1993). "Identification of two point mutations and a one base deletion in exon 19 of the dystrophin gene by heteroduplex formation." *Hum Mol Genet* **2**(3): 311-3.
- Puca, A. A., V. Nigro, et al. (1998). "Identification and characterization of a novel member of the dystrobrevin gene family." *FEBS Lett* **425**(1): 7-13.
- Qin, S., S. P. Cobbold, et al. (1993). ""Infectious" transplantation tolerance." *Science* **259**(5097): 974-7.

- Qin, S. X., S. Cobbold, et al. (1989). "Induction of classical transplantation tolerance in the adult." *J Exp Med* **169**(3): 779-94.
- Qu, Z., L. Balkir, et al. (1998). "Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy." *J Cell Biol* **142**(5): 1257-67.
- Ragot, T., N. Vincent, et al. (1993). "Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice." *Nature* **361**(6413): 647-50.
- Ranheim, E. A. et T. J. Kipps (1993). "Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal." *J Exp Med* **177**(4): 925-35.
- Rapaport, D., O. Fuchs, et al. (1992). "Expression of the Duchenne muscular dystrophy gene products in embryonic stem cells and their differentiated derivatives." *J Biol Chem* **267**(30): 21289-92.
- Roberts, R. G., M. Bobrow, et al. (1992). "Point mutations in the dystrophin gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(6): 2331-5.
- Robinson, S. W., P. W. Cho, et al. (1996). "Arterial delivery of genetically labelled skeletal myoblasts to the murine heart: long-term survival and phenotypic modification of implanted myoblasts." *Cell Transplant* **5**(1): 77-91.
- Rodemann, H. P., L. Waxman, et al. (1982). "The stimulation of protein degradation in muscle by Ca²⁺ is mediated by prostaglandin E₂ and does not require the calcium-activated protease." *J Biol Chem* **257**(15): 8716-23.
- Roman, M., J. H. Axelrod, et al. (1992). "Circulating human or canine factor IX from retrovirally transduced primary myoblasts and established myoblast cell lines grafted into murine skeletal muscle." *Somat Cell Mol Genet* **18**(3): 247-58.
- Rossini, A. A., D. C. Parker, et al. (1996). "Induction of immunological tolerance to islet allografts." *Cell Transplant* **5**(1): 49-52.
- Rothstein, D. M., M. F. Livak, et al. (2001). "Targeting signal 1 through CD45RB synergizes with CD40 ligand blockade and promotes long term engraftment and tolerance in stringent transplant models." *J Immunol* **166**(1): 322-9.
- Rothstein, D. M. et B. G. P. (1999). "Anti-CD45, A new approach towards tolerance induction." *Graft* **2**(6): 239-45.

- Rowland, L. P. (1980). "Biochemistry of muscle membranes in Duchenne muscular dystrophy." *Muscle Nerve* **3**(1): 3-20.
- Roy, R., J. P. Tremblay, et al. (1993). "Antibody formation after myoblast transplantation in Duchenne- dystrophic patients, donor HLA compatible." *Transplant Proc* **25**(1 Pt 2): 995-7.
- Sadoulet-Puccio, H. M., M. Rajala, et al. (1997). "Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(23): 12413-8.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol* **155**(3): 1151-64.
- Salih, M. A., Y. Sunada, et al. (1996). "Muscular dystrophy associated with beta-Dystroglycan deficiency." *Ann Neurol* **40**(6): 925-8.
- Sayegh, M. H., N. A. Fine, et al. (1991). "Immunologic tolerance to renal allografts after bone marrow transplants from the same donors [see comments]." *Ann Intern Med* **114**(11): 954-5.
- Sayegh, M. H. et L. A. Turka (1998). "The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection." *N Engl J Med* **338**(25): 1813-21.
- Sayegh, M. H., X. G. Zheng, et al. (1997). "Donor antigen is necessary for the prevention of chronic rejection in CTLA4Ig-treated murine cardiac allograft recipients." *Transplantation* **64**(12): 1646-50.
- Schlaepfer, D. D., S. K. Hanks, et al. (1994). "Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase." *Nature* **372**(6508): 786-91.
- Schlitt, H. J., J. Hundrieser, et al. (1994). "Donor-type microchimerism associated with graft rejection eight years after liver transplantation." *N Engl J Med* **330**(9): 646-7.
- Schwartz, S. I. (1994). *Principles of surgery*. New York, McGraw Hill Health Professions Division.
- Seino, K. I., K. Fukao, et al. (2001). "Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(5): 2577-81.

- Seung, E., J. P. Mordes, et al. (2003). "Hematopoietic chimerism and central tolerance created by peripheral-tolerance induction without myeloablative conditioning." *J Clin Invest* **112**(5): 795-808.
- Sharabi, Y. et D. H. Sachs (1989). "Mixed chimerism and permanent specific transplantation tolerance induced by a nonlethal preparative regimen." *J Exp Med* **169**(2): 493-502.
- Shevach, E. M. (2001). "Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells." *J Exp Med* **193**(11): F41-6.
- Sicinski, P., Y. Geng, et al. (1989). "The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation." *Science* **244**(4912): 1578-80.
- Simard, L. R., F. Gingras, et al. (1992). "Deletions in the dystrophin gene: analysis of Duchenne and Becker muscular dystrophy patients in Quebec." *Hum Genet* **89**(4): 419-24.
- Simonson, G. D., D. J. Groskreutz, et al. (1996). "Synthesis and processing of genetically modified human proinsulin by rat myoblast primary cultures." *Hum Gene Ther* **7**(1): 71-8.
- Singer, A., K. S. Hathcock, et al. (1981). "Self recognition in allogeneic radiation bone marrow chimeras. A radiation-resistant host element dictates the self specificity and immune response gene phenotype of T-helper cells." *J Exp Med* **153**(5): 1286-301.
- Sivasai, K. S., Y. G. Alevy, et al. (1997). "Peripheral blood microchimerism in human liver and renal transplant recipients: rejection despite donor-specific chimerism." *Transplantation* **64**(3): 427-32.
- Skuk, D., D. Furling, et al. (1999a). "Transplantation of human myoblasts in SCID mice as a potential muscular model for myotonic dystrophy." *J Neuropathol Exp Neurol* **58**(9): 921-31.
- Skuk, D., M. Goulet, et al. (2000a). "Myoblast transplantation in whole muscle of nonhuman primates." *J Neuropathol Exp Neurol* **59**(3): 197-206.
- Skuk, D., B. Roy, et al. (1999b). "Successful myoblast transplantation in primates depends on appropriate cell delivery and induction of regeneration in the host muscle." *Exp Neurol* **155**(1): 22-30.

- Skuk, D. et J. P. Tremblay (2000b). "Progress in myoblast transplantation: a potential treatment of dystrophies." *Microsc Res Tech* **48**(3-4): 213-22.
- Smalheiser, N. R. et E. Kim (1995). "Purification of cranin, a laminin binding membrane protein. Identity with dystroglycan and reassessment of its carbohydrate moieties." *J Biol Chem* **270**(25): 15425-33.
- Sorof, J. M., M. A. Koerper, et al. (1995). "Renal transplantation without chronic immunosuppression after T cell-depleted, HLA-mismatched bone marrow transplantation." *Transplantation* **59**(11): 1633-5.
- Specht, L. A., A. H. Beggs, et al. (1992). "Prediction of dystrophin phenotype by DNA analysis in Duchenne/Becker muscular dystrophy." *Pediatr Neurol* **8**(6): 432-6.
- Starzl, T. E., A. J. Demetris, et al. (1992). "Cell migration, chimerism, and graft acceptance." *Lancet* **339**(8809): 1579-82.
- Starzl, T. E., A. J. Demetris, et al. (1993). "Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance." *Hepatology* **17**(6): 1127-52.
- Stewart, F. M., R. B. Crittenden, et al. (1993). "Long-term engraftment of normal and post-5-fluorouracil murine marrow into normal nonmyeloablated mice." *Blood* **81**(10): 2566-71.
- Straub, V. et K. P. Campbell (1997). "Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex." *Curr Opin Neurol* **10**(2): 168-75.
- Suzuki, A., M. Yoshida, et al. (1994). "Molecular organization at the glycoprotein-complex-binding site of dystrophin. Three dystrophin-associated proteins bind directly to the carboxy-terminal portion of dystrophin." *Eur J Biochem* **220**(2): 283-92.
- Suzuki, A., M. Yoshida, et al. (1995). "Mammalian alpha 1- and beta 1-syntrophin bind to the alternative splice-prone region of the dystrophin COOH terminus." *J Cell Biol* **128**(3): 373-81.
- Suzuki, A., M. Yoshida, et al. (1992). "Glycoprotein-binding site of dystrophin is confined to the cysteine-rich domain and the first half of the carboxy-terminal domain." *FEBS Lett* **308**(2): 154-60.
- Svendsen, U. G., S. Aggestrup, et al. (1999). "Transplantation of a lobe of lung from mother to child following previous transplantation with maternal bone marrow." *J Heart Lung Transplant* **18**(4): 388-90.

- Sykes, M. (2001). "Mixed chimerism and transplant tolerance." *Immunity* **14**(4): 417-24.
- Sykes, M., G. L. Szot, et al. (1998). "Separate regulation of peripheral hematopoietic and thymic engraftment." *Exp Hematol* **26**(6): 457-65.
- Tachi, N., K. Ohya, et al. (1997). "Deficiency of syntrophin, dystroglycan, and merosin in a female infant with a congenital muscular dystrophy phenotype lacking cysteine-rich and C-terminal domains of dystrophin." *Neurology* **49**(2): 579-83.
- Tan, P., C. Anasetti, et al. (1993). "Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1." *J Exp Med* **177**(1): 165-73.
- Tanabe, K., S. Koga, et al. (1996). "Diabetes mellitus after renal transplantation under FK 506 (tacrolimus) as primary immunosuppression." *Transplant Proc* **28**(3): 1304-5.
- Taylor, D. A., B. Z. Atkins, et al. (1998). "Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation." *Nat Med* **4**(8): 929-33.
- Taylor, D. A., S. C. Silvestry, et al. (1997). "Delivery of primary autologous skeletal myoblasts into rabbit heart by coronary infusion: a potential approach to myocardial repair." *Proc Assoc Am Physicians* **109**(3): 245-53.
- Taylor, P. A., R. J. Noelle, et al. (2001). "CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade." *J Exp Med* **193**(11): 1311-8.
- Thomson, A. W. (1990). "Interspecies comparison of the immunosuppressive efficacy and safety of FK 506." *Transplant Proc* **22**(1): 100-5.
- Tokarz, S. A., N. M. Duncan, et al. (1998). "Redefinition of dystrophin isoform distribution in mouse tissue by RT-PCR implies role in nonmuscle manifestations of duchenne muscular dystrophy." *Mol Genet Metab* **65**(4): 272-81.
- Tomita, Y., K. Himeno, et al. (1989). "Establishment of a novel method to induce tolerance in adult mice across fully allogeneic (entire H-2 plus multiminor histocompatibility) antigen barriers, using supralethal irradiation followed by injection of syngeneic bone marrow cells plus (donor X recipient) F1 spleen cells." *Immunobiology* **179**(2-3): 214-29.
- Tomita, Y., A. Khan, et al. (1996a). "Mechanism by which additional monoclonal antibody (mAb) injections overcome the requirement for thymic irradiation to achieve mixed

- chimerism in mice receiving bone marrow transplantation after conditioning with anti-T cell mABs and 3-Gy whole body irradiation." *Transplantation* **61**(3): 477-85.
- Tomita, Y., D. H. Sachs, et al. (1996b). "Additional monoclonal antibody (mAB) injections can replace thymic irradiation to allow induction of mixed chimerism and tolerance in mice receiving bone marrow transplantation after conditioning with anti-T cell mABs and 3-Gy whole body irradiation." *Transplantation* **61**(3): 469-77.
- Tomita, Y., D. H. Sachs, et al. (1994). "Myelosuppressive conditioning is required to achieve engraftment of pluripotent stem cells contained in moderate doses of syngeneic bone marrow." *Blood* **83**(4): 939-48.
- Tomita, Y., M. Yoshikawa, et al. (2000). "Induction of permanent mixed chimerism and skin allograft tolerance across fully MHC-mismatched barriers by the additional myelosuppressive treatments in mice primed with allogeneic spleen cells followed by cyclophosphamide." *J Immunol* **165**(1): 34-41.
- Tortora, G. J., S. R. Grabowski, et al. (1994). *Principes d'anatomie et de physiologie*. Anjou, CEC collégial et universitaire.
- Trambley, J., A. W. Bingaman, et al. (1999). "Asialo GM1(+) CD8(+) T cells play a critical role in costimulation blockade-resistant allograft rejection." *J Clin Invest* **104**(12): 1715-22.
- Tremblay, J. P., F. Malouin, et al. (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.
- Trowbridge, I. S. et M. L. Thomas (1994). "CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development." *Annu Rev Immunol* **12**: 85-116.
- Turka, L. A., P. S. Linsley, et al. (1992). "T-cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(22): 11102-5.
- Valentine, B. A., N. J. Winand, et al. (1992). "Canine X-linked muscular dystrophy as an animal model of Duchenne muscular dystrophy: a review." *Am J Med Genet* **42**(3): 352-6.

- Van Meter, C. H., W. C. Claycomb, et al. (1995). "Myoblast transplantation in the porcine model: a potential technique for myocardial repair." *J Thorac Cardiovasc Surg* **110**(5): 1442-8.
- Van Parijs, L. et A. K. Abbas (1998). "Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off." *Science* **280**(5361): 243-8.
- van Pel, M., D. W. van Breugel, et al. (2003). "Towards a myeloablative regimen with clinical potential: I. Treosulfan conditioning and bone marrow transplantation allow induction of donor-specific tolerance for skin grafts across full MHC barriers." *Bone Marrow Transplant* **32**(1): 15-22.
- Vial, T. et J. Descotes (2003). "Immunosuppressive drugs and cancer." *Toxicology* **185**(3): 229-40.
- Vilquin, J. T., I. Asselin, et al. (1995a). "Successful myoblast allotransplantation in mdx mice using rapamycin." *Transplantation* **59**(3): 422-6.
- Vilquin, J. T., B. Guerette, et al. (1995b). "FK506 immunosuppression to control the immune reactions triggered by first-generation adenovirus-mediated gene transfer." *Hum Gene Ther* **6**(11): 1391-401.
- Vilquin, J. T., P. F. Kennel, et al. (2001). "Electrotransfer of naked DNA in the skeletal muscles of animal models of muscular dystrophies." *Gene Ther* **8**(14): 1097-107.
- Vilquin, J. T., I. Kinoshita, et al. (1995c). "Cyclophosphamide immunosuppression does not permit successful myoblast allotransplantation in mouse." *Neuromuscul Disord* **5**(6): 511-7.
- Vilquin, J. T., E. Wagner, et al. (1995d). "Successful histocompatible myoblast transplantation in dystrophin- deficient mdx mouse despite the production of antibodies against dystrophin." *J Cell Biol* **131**(4): 975-88.
- Vincenti, F. (2002). "What's in the pipeline? New immunosuppressive drugs in transplantation." *Am J Transplant* **2**(10): 898-903.
- Wakayama, Y., M. Inoue, et al. (1997). "Ultrastructural localization of alpha 1-syntrophin and neuronal nitric oxide synthase in normal skeletal myofiber, and their relation to each other and to dystrophin." *Acta Neuropathol (Berl)* **94**(5): 455-64.
- Waldmann, H. et S. Cobbold (2001a). "Regulating the immune response to transplants. a role for CD4+ regulatory cells?" *Immunity* **14**(4): 399-406.

- Waldmann, H., G. Hale, et al. (2001b). "Appropriate targets for monoclonal antibodies in the induction of transplantation tolerance." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**(1409): 659-63.
- Wang, B., J. Li, et al. (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.
- Wang, J. M., H. Zheng, et al. (1997). "Persistent systemic production of human factor IX in mice by skeletal myoblast-mediated gene transfer: feasibility of repeat application to obtain therapeutic levels." *Blood* **90**(3): 1075-82.
- Way, M., B. Pope, et al. (1992). "Expression of the N-terminal domain of dystrophin in *E. coli* and demonstration of binding to F-actin." *FEBS Lett* **301**(3): 243-5.
- Weiner, H. L. (1997). "Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases." *Immunol Today* **18**(7): 335-43.
- Wekerle, T., J. Kurtz, et al. (2000). "Allogeneic bone marrow transplantation with co-stimulatory blockade induces macrochimerism and tolerance without cytoreductive host treatment." *Nat Med* **6**(4): 464-9.
- Wekerle, T., M. H. Sayegh, et al. (1998). "Extrathymic T cell deletion and allogeneic stem cell engraftment induced with costimulatory blockade is followed by central T cell tolerance." *J Exp Med* **187**(12): 2037-44.
- Wekerle, T. et M. Sykes (2001). "Mixed chimerism and transplantation tolerance." *Annu Rev Med* **52**: 353-70.
- Wells, A. D., X. C. Li, et al. (1999). "Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance." *Nat Med* **5**(11): 1303-7.
- Wells, A. D., X. C. Li, et al. (2001). "The role of peripheral T-cell deletion in transplantation tolerance." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**(1409): 617-23.
- Wijdicks, E. F., R. H. Wiesner, et al. (1994). "FK506-induced neurotoxicity in liver transplantation." *Ann Neurol* **35**(4): 498-501.
- Williams, M. A., J. T. Tan, et al. (2001). "Characterization of virus-mediated inhibition of mixed chimerism and allospecific tolerance." *J Immunol* **167**(9): 4987-95

- Williams, M. A., J. Trambley, et al. (2000). "Genetic characterization of strain differences in the ability to mediate CD40/CD28-independent rejection of skin allografts." *J Immunol* **165**(12): 6849-57.
- Wong, P. Y. et W. Y. Cheung (1979). "Calmodulin stimulates human platelet phospholipase A2." *Biochem Biophys Res Commun* **90**(2): 473-80.
- Wood, K. et D. H. Sachs (1996). "Chimerism and transplantation tolerance: cause and effect." *Immunol Today* **17**(12): 584-7; discussion 588.
- Wood, K. J. et S. Sakaguchi (2003). "Regulatory T cells in transplantation tolerance." *Nat Rev Immunol* **3**(3): 199-210.
- Wrogemann, K. et S. D. Pena (1976). "Mitochondrial calcium overload: A general mechanism for cell-necrosis in muscle diseases." *Lancet* **1**(7961): 672-4.
- Yamamoto, H., Y. Hagiwara, et al. (1993). "Heterogeneity of dystrophin-associated proteins." *J Biochem (Tokyo)* **114**(1): 132-9.
- Yang, B., D. Jung, et al. (1995). "SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2." *J Biol Chem* **270**(20): 11711-4.
- Yang, Y., F. A. Nunes, et al. (1994). "Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(10): 4407-11.
- Yarom, R., G. E. Morris, et al. (1992). "Myocardial dystrophin immunolocalization at sarcolemma and transverse tubules." *Experientia* **48**(6): 614-6.
- Zatz, M., A. M. Vianna-Morgante, et al. (1981). "Translocation (X;6) in a female with Duchenne muscular dystrophy: implications for the localisation of the DMD locus." *J Med Genet* **18**(6): 442-7.
- Zelenika, D., E. Adams, et al. (2002). "Regulatory T cells overexpress a subset of Th2 gene transcripts." *J Immunol* **168**(3): 1069-79.
- Zeng, D., D. Lewis, et al. (1999). "Bone marrow NK1.1(-) and NK1.1(+) T cells reciprocally regulate acute graft versus host disease." *J Exp Med* **189**(7): 1073-81.
- Zhang, Z. X., L. Yang, et al. (2000). "Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression." *Nat Med* **6**(7): 782-9.
- Zhou, J., R. I. Carr, et al. (2001). "Oral exposure to alloantigen generates intragraft CD8+ regulatory cells." *J Immunol* **167**(1): 107-13.

Zubrzycka-Gaarn, E. E., D. E. Bulman, et al. (1988). "The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle." *Nature* **333**(6172): 466-9.

Zubrzycka-Gaarn, E. E., O. F. Hutter, et al. (1991). "Dystrophin is tightly associated with the sarcolemma of mammalian skeletal muscle fibers." *Exp Cell Res* **192**(1): 278-88.