

Perspectives des thérapies cellulaires dans la dystrophie musculaire de Duchenne

par Alain Sebillé

Atelier de Régénération Neuromusculaire, Faculté de Médecine Saint-Antoine, 27, rue Chaligny, 75012 Paris.

E-mail : sebillé@ext.jussieu.fr

Reçu le 17 mars 2004

RÉSUMÉ

Le muscle squelettique strié est constitué de fibres postmitotiques multinucléées qui sont les agents de la contraction. Ces fibres résultent de la fusion de cellules mononucléées précurseurs ayant migré des somites vers l'emplacement du muscle. La cascade d'événements qui conduisent à la différenciation myogénique de ces cellules est aujourd'hui bien détaillée (Sabourin et Rudnicki, 2000). Certaines cellules précurseurs présentes dans le muscle adulte sont nommées cellules satellites (Mauro, 1961) du fait de leur localisation entre la membrane plasmique et la matrice

extracellulaire de la fibre musculaire. A cause de leur rôle dans la croissance et la régénération du muscle, elles ont été les premières cellules candidates pour traiter les dystrophies musculaires. Malgré de nombreuses données expérimentales positives sur la transplantation de ces cellules, aucun résultat clinique effectif n'a été obtenu à ce jour. Toutefois cette attente de résultats a permis une réflexion très riche sur l'hétérogénéité de ces cellules précurseurs musculaires et sur leur mode possible d'administration.

SUMMARY Cell therapy prospects in Duchenne muscular dystrophy

Skeletal muscle is made of multinucleated postmitotic fibers which are the agents of contraction. These fibers arise from mononuclear precursor cells which fuse after having migrated from the somites to the site of myogenesis. The cascade of events which result in muscle differentiation is well known nowadays (Sabourin & Rudnicki, 2000). Some precursor cells present in adults muscle are termed satellite cells (Mauro, 1961), because of their location between the plasma mem-

brane and the extracellular matrix of muscle fibers. Since they have a role in muscle growth and regeneration, these cells were the first candidates for treating muscle dystrophies. Despite a large corpus of positive experimental data about transplantation of these cells, no hard clinical result has been obtained to date. However these investigations have led to fruitful thinking about heterogeneity of muscle cell precursors and the possible ways to use them for therapy.

LES CELLULES SATELLITES ET LA RÉGÉNÉRATION MUSCULAIRE POST-TRAUMATIQUE

Les cellules satellites apparaissent dans les membres après la formation des fibres musculaires primaires et leur origine reste débattue (somite, aorte dorsale...). Visualisées par la microscopie électronique lors de leur découverte, certaines d'entre elles peuvent être aujourd'hui détectées grâce à des protéines qui leur sont spécifiques comme la M-cadhérine, c-met, MNF (myocyte nuclear factor) ou pax 7 (Hawke & Garry, 2001). Par ailleurs il a été montré que les cellules satellites quiescentes exprimaient chez la souris le facteur myogénique Myf 5 et le marqueur CD 34 qui est aussi présent sur les cellules souches hématopoïétiques activées (Beauchamp *et al.*, 2000). Toutefois il n'est pas certain que cette

population de cellules soit homogène puisque certaines d'entre elles expriment une de ces protéines mais pas les autres (Zammit *et al.*, 2002). Durant la période post-natale, les cellules satellites vont se multiplier et la majorité d'entre-elles vont fusionner avec les fibres déjà formées pour assurer leur croissance. Seul un petit nombre vont rester quiescentes pour assurer l'existence d'un réservoir de cellules satellites chez l'adulte dont le volume se restreint avec l'âge (Bischoff, 1994). C'est cette possibilité pour les cellules filles résultant de la multiplication des cellules satellites d'opter soit pour la différenciation-fusion soit pour un auto-renouvellement du stock initial qui a fait nommer récemment les cellules satellites : cellules souches musculaires adultes. Chez l'adulte, elles ne se remettent à proliférer qu'en cas de destruction des fibres musculaires. Elles expriment alors les facteurs myogéniques régulateurs comme au cours de la crois-

sance, et de leur fusion vont naître des myotubes dont la maturation, c'est-à-dire la synthèse des protéines contractiles, aboutira à une fibre d'allure normale exceptée la présence de noyaux non périphériques dans le cytoplasme. Un myotube contenu dans la matrice extracellulaire d'une fibre partiellement lésée peut aussi fusionner avec les deux extrémités intactes de celle-ci. Parmi les facteurs qui régulent la prolifération, la différenciation et la fusion des cellules satellites, certains sont présents localement dans la matrice extracellulaire non lésée (bFGF par exemple), d'autres sont apportés par les cellules macrophagiques circulantes attirées par les débris des fibres lésées qu'elles phagocytent (PDGF, TGF β , bFGF, LIF... voir Bischoff, 1997). Si la plupart des cellules satellites qui assurent la régénération musculaire proviennent de la zone musculaire lésée, d'autres proviennent de régions plus éloignées d'où elles migrent et il n'est pas exclu que des cellules des muscles voisins puissent participer ainsi que des cellules d'origine sanguine (Seale & Rudnick, 2000). Le rôle joué par les cellules satellites dans la régénération est à l'origine de l'idée d'introduire des cellules musculaires précurseurs dans un muscle lésé ou non pour induire la formation de nouvelles fibres musculaires à partir de ces cellules étrangères au muscle.

EXPÉRIMENTATIONS CHEZ L'ANIMAL

Les progrès successifs de l'implantation de cellules précurseurs musculaires pour aboutir à la formation de fibres dystrophine positives dans un muscle dépourvu de cette protéine passent par quatre étapes.

En 1978, Partridge *et al.* profitent du fait que des souris AKR et C3H sont homozygotes pour des formes alléliques de la glucose-6-phosphate isomérase pour injecter un muscle émincé d'une souche dans le jambier antérieur de l'autre rendue immunotolérante. Les fibres du muscle greffé ont montré histologiquement et par électrophorèse la présence de fibres contenant, chacune, des isoenzymes et, dans un certain nombre, un hybride. Cette expérience montrait la possibilité d'incorporer des cellules précurseurs musculaires dans des fibres post natales chez l'adulte à partir des cellules contenues dans un muscle émincé.

En 1979, Law and Yap montrent que l'introduction d'un soléaire de nouveau né de souris C57BL/6J dans le jambier antérieur d'une souris dystrophique syngénique C57BL/6J-dy entraîne 6 mois plus tard une augmentation de la surface de section du muscle greffé, ainsi que de la force de la secousse et du tétanos musculaire. Le devenir des cellules greffées n'a pas été recherché.

En 1987, simultanément, Alameddine *et al.* et Morgan *et al.* régénèrent un muscle dont les fibres et les cellules satellites sont détruites par irradiation en injectant, après l'irradiation, des cellules précurseurs musculaires cultivées à partir d'un autre muscle du même animal.

En 1989, Partridge *et al.* convertissent des fibres dystrophine-négatives en dystrophine-positives chez la souris nude-mdx en injectant des cellules précurseurs nor-

males qui s'incorporent aux fibres du muscle receveur mais aussi donnent naissance à des myotubes.

De cette dernière expérience germe l'idée que l'application clinique de ce résultat pourrait être envisageable sans délai.

PREMIERS ESSAIS CLINIQUES

Dès la connaissance des résultats de Partridge *et al.* en 1988 et avant même leur publication, un meeting fut organisé à New York par *Muscular Dystrophy Association* (MDA) (débats colligés par Griggs & Karpati, 1990) pour débattre de l'opportunité de réaliser les premiers transferts de cellules précurseurs musculaires (essais de faisabilité dits de phase I) chez des patients atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Selon l'un des membres présents, le débat fut houleux (Partridge 2002). Les grandes craintes concernaient l'apparition de tumeurs (sarcomes) résultant de l'injection des cellules et la réaction immunologique consécutive à l'injection. Malgré ces objections, quatre essais indépendants d'injection de cellules précurseurs musculaires saines et HLA compatibles furent décidés et financés par MDA. À partir de 1992, les premiers résultats de ces essais furent présentés par trois groupes. Aucun bénéfice clinique ou fonctionnel ne fut obtenu (Karpati *et al.*, 1993 ; Mendell *et al.*, 1995 ; Gussoni *et al.*, 1997). Dans l'un d'entre eux (Gussoni *et al.*, 1992), des transcrits de la dystrophine auraient été décelés. Le quatrième groupe prétendit avoir obtenu de bons résultats mais ceux-ci ne purent jamais être validés de façon indépendante et ils furent généralement peu pris en considération (Law *et al.*, 1997).

À la même époque, un autre essai financé par l'Association Française contre les Myopathies (AFM) se fixa pour but de rechercher un éventuel rejet des cellules greffées (Roy *et al.*, 1993). Il s'avéra que des cellules compatibles pour les antigènes HLA engendraient des anticorps contre les antigènes mineurs et contre la dystrophine elle-même.

Comme le souligne Partridge (2002), le grand intérêt de ces essais réside dans la démonstration qu'il n'y eut aucun effet délétère. Dans le long terme, aucune tumeur ne fut signalée et les réactions immunitaires furent sans conséquence. En fait, ces essais ont soulevé trois problèmes qui ont réorienté les expérimentations précliniques : le rejet immunologique des cellules injectées, la survie des cellules après leur injection et la voie de délivrance des cellules pour faciliter leur migration dans le muscle receveur.

LE REJET DES CELLULES GREFFÉES

On a vu que ce rejet était dû aux antigènes HLA, aux antigènes mineurs et à la présence de la dystrophine dans les cellules injectées. Ces trois causes entraînent un rejet massif des cellules injectées. Toutefois, si l'usage de la cyclosporine n'est que peu efficace pour lutter contre ce rejet aussi bien dans les tentatives expérimentales (Watt

et al., 1984) que lors d'un des essais cliniques (Karpati *et al.*, 1993), la rapamycine et le tacrolimus semblent en revanche très efficaces chez la souris (Kinoshita *et al.*, 1994; Vilquin *et al.*, 1995). Chez le primate, l'association de ces deux molécules paraît nécessaire pour être efficace (Skuk *et al.*, 2002). Dans une perspective clinique, la question qui se pose est celle de la toxicité connue de ces molécules à la dose efficace qui devrait être prescrite chez de jeunes patients de façon chronique. C'est pourquoi des tentatives ont été menées pour faire exprimer la dystrophine par les propres cellules du patient mais sans application clinique pour l'instant (Moisset *et al.*, 1998).

LA SURVIE DES CELLULES INJECTÉES

Plus de 95 % des cellules injectées provenant d'une culture primaire disparaissent dans les 24 heures après l'injection dans un muscle immunotolérant (Skuk & Tremblay, 1998). En fait, il semblerait qu'il existe deux populations de cellules précurseurs musculaires parmi les cellules satellites que l'on peut extraire d'un muscle (Beauchamps *et al.*, 2000). D'une part une population majoritaire qui exprime la cadhérine, CD34, Myf5 et pax7 chez la souris. Cette population déjà différenciée serait celle qui disparaîtrait. D'autre part des cellules peu nombreuses, n'exprimant pas les précédentes molécules, à croissance lente en culture mais capables d'une multiplication rapide après injection dans un muscle receveur, qui constitueraient la population efficace pour régénérer le muscle. Cette population mineure pourrait être sélectionnée par des techniques appropriées de culture comme le «pre-plating» (Rando & Blau, 1994) ou la culture en basse densité (Pinset & Montarras, 1998). Ces cellules seraient elles-mêmes subdivisées en une sous-population exprimant les marqueurs Sca1, cKit, CD43, mais pas CD45 comme certaines cellules hématopoïétiques. Ces cellules séparées par tri (FACS) pourraient être pluripotentes (Gussoni *et al.*, 1999). On peut alors se poser la question de savoir si les cellules satellites sont la source unique de cellules susceptibles d'être utilisées en thérapie cellulaire. En effet, si des cellules extramusculaires (originaires de la moelle sanguine ou de l'endothélium) étaient susceptibles de participer à la formation des fibres musculaires striées squelettiques, il conviendrait d'accepter l'idée que leur dissémination dans le muscle se fasse par voie systémique, ce qui résoudrait le paradigme de l'accès à un grand nombre de muscles lésés dans les maladies musculaires génétiques. Ces observations résultant de l'engouement actuel pour les cellules «souches» ne font que redonner de la vigueur aux idées plus anciennes qui avaient tenté de régénérer le muscle à partir des nombreux fibroblastes qu'il contient.

INTRODUCTION ET MIGRATION DES CELLULES PRÉCURSEURS DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE STRIÉ

Actuellement prévaut l'injection intramusculaire à la seringue faute de mieux pour introduire les cellules dans

les muscles. Du fait de la faible dispersion et de la migration modeste des cellules injectées, ces injections sont multiples et pratiquées à distance très rapprochée. Par ailleurs, les muscles profonds sont inaccessibles en particulier le diaphragme. La voie idéale serait la voie vasculaire qui résoudrait simultanément le problème de la voie d'accès et celui de la dissémination. Cette voie est d'autant plus envisageable que l'évolution des techniques favorise actuellement la «radiologie interventionnelle» capable d'accéder par voie endovasculaire à tous les organes et d'y pratiquer les gestes les plus minutieux. Se pose alors le problème de la migration transpariétale des cellules à délivrer. Des clones de cellules Sca1+/CD34-/L-selectine + se sont montrés capables d'adhérer fermement à l'endothélium vasculaire des muscles de souris mdx (Torrente *et al.*, 2003). Neutralisées par des anticorps antiselectine ces cellules ne sont plus adhérentes malgré la présence d'un ligand spécifique dans la paroi vasculaire des souris mdx (*mucosal adressin cell adhesion molecule-1* ou Mad-CAM-1). Ce résultat est un des premiers pas vers la dissémination systémique. Le passage transpariétal reste toujours à résoudre.

PERSPECTIVES POUR UNE THÉRAPIE CELLULAIRE EFFICACE

Après des tentatives prématurées de transferts de myoblastes dans la maladie de Duchenne, cette voie thérapeutique est loin d'être écartée devant les problèmes posés par la mise en route des thérapies géniques. Simplement, la vision actuelle d'une thérapie cellulaire a beaucoup évolué depuis l'angélisme des années 90. La population cellulaire efficace qu'il convient d'utiliser, qu'elle soit d'origine musculaire ou hématopoïétique, paraît mieux ciblée aujourd'hui qu'à cette époque même si le débat concernant les cellules souches a brouillé temporairement les choses. La dissémination des cellules par voie vasculaire s'impose comme incontournable pour les affections musculaires généralisées. Comme certaines cellules extramusculaires sont susceptibles de sortir des vaisseaux pour gagner des organes, la perspective d'orienter de telles cellules vers un lignage musculaire est envisageable par la stimulation de gènes appropriés, éventuellement par supplémentation. Si ces cellules sont autologues, on peut espérer supprimer ou limiter les réactions immunitaires aux antigènes majeurs et mineurs et peut-être à la dystrophine. Même si cette voie paraît toujours balbutiante, il n'est pas douteux qu'elle est la seule qui puisse reconstruire des muscles fonctionnels chez les patients handicapés en apportant de nouvelles fibres saines à l'abri de toute dégénérescence ultérieure.

BIBLIOGRAPHIE

Alameddine H., Dehaupas M. & Fardeau M., Régénération musculaire par autogreffe de cellules satellites multipliées *in vitro*. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 1987, 304, 493-498.

- Beauchamp J. R., Heslop L., Yu D. S. W., Tajbakhsh S., Kelly R. G., Werning A., Buckingham M. E., Partridge T. A. & Zammit P. S., Expression of CD 34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J. Cell Biol.*, 2000, 151, 1221-1233.
- Bischoff R., The satellite cell and muscle regeneration In : Engel A. G. & Franzini-Amstrong C., editors, *Myology*, Mc Graw Hill NY, 1994, 97-118.
- Bischoff R., Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells. *Develop. Dynamics*, 1997, 208, 505-515.
- Griggs R. C., Karpati G., editors. *Myoblast transfer therapy: Plenum press*, New York, NY, 1990.
- Gussoni E., Pavlath G. K., Lanctot A. M., Sharma K. R., Miller R. G., Steinman L. & Blau H. M., Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature*, 1992, 356, 435-438.
- Gussoni E., Blau H. M. & Kunkel L. M., The fate of individual myoblasts after transplantation into muscles of DMD patients. *Nat. Med.*, 1997, 3, 970-976.
- Gussoni E., Soneoka Y., Strickland C. D., Buzney E. A., Khan M. K., Flink A. F., Kunkel L. M. & Mulligan R. C., Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*, 1999, 401, 390-394.
- Hawke T. J. & Garry D. J., Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J. Applied Physiol.*, 2001, 91, 534-551.
- Karpati G., Adukovic D., Arnold D., Gledhill R. B., Guttmann R., Holland P., Koch P. A., Shoubridge E., Spence D., Vanasse M. *et al.*, Myoblast transfer in Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.*, 1993, 34, 8-17.
- Kinoshita I., Vilquin J. T., Guerette B., Asselin I., Roy R. Lille S. & Tremblay J. P., Immunosuppression with FK 506 insures good success of myoblast transplantation in MDX mice, *Transplant. Proc.*, 1994, 26, 3518.
- Law P. K. & Yap J. L., New muscle transplant method produces normal twitch tension in dystrophic muscle, *Muscle & Nerve*, 1979, 2, 356-363.
- Law P. K., Goodwin T. G., Fang Q., Hall T. L., Quinley T., Vastagh G., Duggirala V., Larkin C., Florendo J. A., Li L., Jackson T., Yoo T. J., Chase N., Neel M., Krahn T. & Holcomb R., First human myoblast transfer therapy continues to show dystrophin after 6 years. *Cell Transplant*, 1997, 6, 95-100.
- Mauro A., Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem.*, 1961, 9, 493-495.
- Mendell J. R., Kissel J. T., Amato A. A., King W., Signore L., Prior T. W., Sahenk Z., Benson S., McAndrew P. E., Rice R. *et al.*, Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N. Eng. J. Med.*, 1995, 333, 832-838.
- Moisset P. A., Skuk D., Asselin I., Goulet M., Roy B., Karpati G. & Tremblay J. P., Successful transplantation of genetical corrected DMD myoblasts following *ex vivo* transduction with the dystrophin minigene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, 247, 94-99.
- Morgan J. E., Coulton G. R. & Partridge T., Muscle precursor cells invade and repopulate freeze-killed muscles. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 1987, 5, 386-396.
- Partridge T. A., Myoblast transplantation. *Neuromusc. Disord.*, 2002, 12, S3-S6.
- Partridge T. A., Grounds M. & Sloper J. C., Evidence of fusion between host and donor myoblasts in skeletal muscle grafts. *Nature*, 1978, 273, 306-308.
- Partridge T. A., Morgan J. E., Coulton G. R., Hoffman E. P. & Kunkel L. M., Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature*, 1989, 337, 176-179.
- Pinset C. & Montarras D., Cell systems for *ex vivo* studies of myogenesis: a protocol for the isolation of stable muscle cell population from newborn to adult mice. In : Celis J., editor. *Cell biology: a laboratory handbook*. 2nd edition, *Academic Press*, New York, 1998, pp. 226-232.
- Rando T. A., Blau H. M., Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. *J. Cell Biol.*, 1994, 125, 1275-1287.
- Roy R., Tremblay J. P., Huard J., Richards C., Malouin F., Bouchard J. P., Antibody formation after myoblast transplantation in Duchenne-dystrophic patients, donor HLA compatible. *Transplant. Proc.*, 1993, 25, 995-997.
- Sabourin L. A. & Rudnicki M. A., The molecular regulation of myogenesis. *Clin. Gen.*, 2000, 57, 16-25.
- Seale P. & Rudnicki M. A., A new look at the origin, function and « stem-cell » status of muscle satellite cells. *Develop. Biol.*, 2000, 218, 115-124.
- Skuk D. & Tremblay J. P., Complement deposition and cell death after myoblast transplantation. *Cell Transplant.*, 1998, 7, 427-434.
- Shuk D., Goulet M., Roy B. & Tremblay J. P., Efficacy of myoblast transplantation in nonhuman primates following simple intramuscular cell injections: toward defining strategies applicable to humans. *Exp. Neurol.*, 2002, 175, 112-126.
- Torrente Y., Camirand G., Pisati F., Belicchi M., Rossi B., Colombo F., El Fahime M., Caron N., Isssekutz A. C., Constantin G., Tremblay P. J. & Bresolin N., Identification of a putative pathway for the muscle homing of stem cells in a muscle dystrophy model. *J. Cell Biol.*, 2003, 162, 511-520.
- Vilquin J. T., Asselin I., Guerette B., Kinoshita I., Roy R. & Tremblay J. P., Successful myoblast allotransplantation in mdx mice using rapamycin. *Transplantation*, 1995, 59, 422-426.
- Watt D. J., Morgan J. E. & Partridge T. A., Long-term survival of allografted muscle precursor cells following a limited period of treatment with cyclosporin A. *Clin. Exp. Immunol.*, 1984, 55, 419-426.
- Zammit P. S., Heslop L., Hudon V., Rosenblatt J. D., Tajbakhsh S., Buckingham M. E., Beauchamp J. R. & Partridge T. A., Kinetics of myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate skeletal muscle fibers. *Exp. Cell. Res.*, 2002, 281, 39-49.