

# Thèse de Doctorat

Florence ROBRIQUET

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : *Biologie Santé*

Discipline : *Biologie, médecine et santé*  
Spécialité : *Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie*  
Unité de recherche : *UMR 703 PAnTher INRA/Oniris*

Soutenue le *31 Octobre 2014*

## Cellules souches adultes MuStem :

« Exploration de leur phénotype et leurs modalités d'action »

### JURY

Président du jury :	<b>Romain GHERARDI</b> , PUPH, UMR 955 Inserm, Faculté de Médecine de Créteil
Rapporteurs :	<b>Gillian BUTLER-BROWNE</b> , DR, UM76 UPMC Sorbonne Universités - U974 Inserm - FRE3617 CNRS/AIM, Paris <b>David ISRAELI</b> , DR, Généthon, Evry
Examineurs :	<b>Romain GHERARDI</b> , PUPH, UMR 955 Inserm, Faculté de Médecine de Créteil <b>Dominique HEYMANN</b> , PUPH, UMR 957 Inserm, Faculté de Médecine de Nantes
Directeur de Thèse :	<b>Laëtitia GUEVEL</b> , MCU, UMR 703 PAnTher INRA/Oniris, Nantes
Co-encadrant de Thèse :	<b>Karl ROUGER</b> , CR, UMR 703 PAnTher INRA/Oniris, Nantes



## Remerciements

Je remercie Gillian Butler-Browne, David Israeli, Romain Gherardi et Dominique Heymann d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse et d'évaluer mes travaux.

Je remercie Marie-Anne Colle et Karl Rouger pour m'avoir accueillie au sein de l'UMR 703 PAnTher INRA/Oniris.

Je tiens à remercier chaleureusement Laëtitia Guével pour m'avoir encadrée depuis le Master 2, pour son optimisme et son dynamisme, mais aussi pour avoir toujours su me motiver. J'ai beaucoup appris scientifiquement et humainement à tes côtés.

Je remercie également Karl Rouger pour m'avoir donné l'opportunité de travailler pour le projet MuStem. Merci pour toutes nos discussions sur la biologie cellulaire et ton esprit critique. Merci aussi pour m'avoir donné les moyens d'atteindre mes objectifs scientifiques en mettant en place de nombreuses collaborations.

Je remercie Laurence Jeanson-Leh pour m'avoir accueillie durant 2 semaines au Généthon dans le cadre de notre collaboration sur l'étude des miRNAs circulants.

Je remercie Grégory Jouvion, Mathilde Latil et Fabrice Chrétien pour le mois que j'ai eu plaisir à passer dans leur équipe à l'Institut Pasteur, dans le cadre de mon travail sur l'hypoxie.

Je remercie Christian Pinset et Emmanuelle Massourides d'I-Stem pour nos discussions sur la pluripotence des cellules et leur aide.

Je remercie Lisa Oliver de l'UMR 892 Inserm pour m'avoir donné accès à la chambre hypoxique.

Je remercie Aurélie Lardenois pour sa sympathie, pour le plaisir que j'ai eu à travailler avec, pour son regard critique et ses conseils.

Je remercie Blandine Lieubeau pour sa disponibilité, ses conseils pratiques, sa sympathie et tous les moments passés au FACS.

Je remercie Laurence Dubreil pour ses conseils avisés, pour son aide et la réalisation de nombreux clichés au microscope confocal.

Je remercie Mireille Ledevin et Hélicia Goubin pour la réalisation des expériences d'immunohistologie et leur gentillesse.

Je remercie Thibaut Larcher pour l'apport de ses connaissances vétérinaires et son aide. (Et aussi parce que tu sais apprécier le bleu klein !)

Je remercie Candice Babarit, membre de la « team BM », pour son aide technique, pour son enthousiasme, pour le plaisir que j'ai eu à travailler avec mais également pour nos agréables soirées « Pikatchu ».

Je remercie Cindy Schleder et Isabelle Leroux pour leurs conseils, leur aide précieuse, leur sympathie et nos nombreux fous rires en culture !

Je remercie tout particulièrement Judith qui m'a « supportée » au quotidien durant ses 3 années. Ce fut un plaisir d'être dans le même bureau que toi. Nous avons formé, je le pense, un beau duo de doctorantes qui n'a rien à envier à Louis de Funès et Pierre Richard...

Je remercie également les doctorants « Neuros », comme j'aime les appeler, Karim et Juliette. Merci pour leur sympathie et leur soutien. J'ai particulièrement apprécié la très bonne entente qui règne au laboratoire entre les doctorants.

Je remercie aussi les résidents « AnaPath » Cynthia, Nicolas et Quentin pour leur soutien et leur humour un peu « fou ».

Je remercie également les différents stagiaires que j'ai co-encadré, Benoît, Yvanna et tout partiellement Sabrina pour son optimisme et sa grande motivation.

Je remercie très sincèrement tous les membres de l'UMR 703 PAnTher.

Je mets un point d'honneur à remercier tous mes amis, indispensables à mon équilibre : Mélanie et mes amis vendéens, Laëtitia K, Sabrina, Estelle, Jérôme, Mimeline, Anthony, Freddy, Guillaume, Pauline, Alexis, Louise, Gilles, Laëtitia T, Sandrine, Kévin et le « troupeau » (de moutons bien sûr !).

Je remercie mes grand-parents. J'apprécie vous retrouver à la Pironnière autour d'une tasse de café.

Je remercie mes parents et mon frère pour leur bienveillance et leur soutien tout au long de mes études.

Je remercie mon chéri pour son soutien et notre belle histoire !

## Abréviations

<b>AAV</b>	Adenovirus-associated Virus
<b>ACP</b>	Analyse en Composante Principale
<b>ADIPOQ</b>	Adiponectine
<b>ADNc</b>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>ALDH</b>	Aldéhyde Déshydrogénase
<b>AONs</b>	Oligonucléotides Antisens
<b>ASC</b>	Adipose-derived Stem Cells
<b>β-DG</b>	β-Dystroglycane
<b>BMD</b>	Dystrophie Musculaire de Becker
<b>CK</b>	Créatine Kinase
<b>CSH</b>	Cellules Souches Hématopoïétiques
<b>CSM</b>	Cellules Souches Mésenchymateuses
<b>CXMDJ</b>	Canine X-Linked Muscular Dystrophy
<b>DAPC</b>	Dystrophin-Associated Protein Complex
<b>DMD</b>	Dystrophie Musculaire de Duchenne
<b>ECG</b>	Electrocardiogramme
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>ES</b>	Cellules Souches Embryonnaires
<b>FACS</b>	Fluorescence-Activated Cell Sorting
<b>FGF</b>	Fibroblast Growth Factor
<b>GO</b>	Gene Ontology
<b>GRMD</b>	Golden Retriever Muscular Dystrophy
<b>GSH</b>	Glutathione
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Péroxyde d'hydrogène
<b>HDAC</b>	Histone Deacetylase
<b>HIF</b>	Hypoxia Inducible Factor
<b>IGF</b>	Insulin-like Growth Factor
<b>iPS</b>	Cellules Pluripotentes Induites
<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinases
<b>MDSC</b>	Cellules Souches Dérivées du Muscle
<b>mdx</b>	X-linked muscular dystrophy
<b>MEC</b>	Matrice extracellulaire
<b>miRNA</b>	microARN
<b>MMP</b>	Matrix Metalloproteinase
<b>MRFs</b>	Facteurs de Régulation Myogénique
<b>MYH</b>	Chaînes lourdes de la Myosine
<b>NF-κB</b>	Nuclear Factor-kappa B
<b>nNOS</b>	neuronal Nitric Oxide Synthase
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxygène
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline

<b>pp</b>	Preplating
<b>PTEN</b>	Phosphatase and Tensin homolog
<b>RIN</b>	RNA Integrity Number
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>RT</b>	Transcription inverse
<b>SAC</b>	Slow Adhering Cells
<b>SCID</b>	Severe Combined Immunodeficiency
<b>SDF-1</b>	Stromal-Derived Factor-1
<b>SP</b>	Side Population
<b>SPP1</b>	Ostéopontine
<b>SSEA</b>	Stage Specific Embryonic Antigen
<b>SVF</b>	Sérum de Veau Fœtal
<b>TA</b>	Température ambiante
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factor-beta
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor-alpha
<b>UPS</b>	Ubiquitin-Proteasome System
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor

# Table des matières

<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>5</b>
<b>Chapitre 1. La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD).....</b>	<b>7</b>
1.1 Généralités .....	7
1.2 Manifestations cliniques.....	8
1.3 Dystrophine et complexe protéique associé .....	10
1.3.1 Dystrophine.....	10
1.3.1.1 Structure de la dystrophine.....	10
1.3.1.2 Rôles de la dystrophine .....	10
1.3.2 Complexe dystrophine-glycoprotéines associées.....	11
1.3.3 Conséquences de l'absence de dystrophine.....	12
1.3.3.1 Conséquences primaires .....	13
1.3.3.2 Conséquences secondaires .....	13
1.4 Modèles animaux de la DMD .....	15
1.4.1 Modèles rongeurs .....	15
1.4.1.1 Souris <i>mdx</i> .....	15
1.4.1.2 Souris doubles mutantes.....	16
1.4.1.3 Rat <i>DMD<sup>mdx</sup></i> .....	18
1.4.2 Modèles canins .....	18
1.4.2.1 Chien GRMD .....	18
A. Caractérisation et évolution clinique .....	19
B. Phénotype tissulaire .....	20
1.4.2.2 Chien CXMDJ .....	21
1.4.3 Autres modèles .....	22
<b>Chapitre 2. Les stratégies thérapeutiques de la DMD .....</b>	<b>23</b>
2.1 Traitements pharmacologiques.....	24
2.1.1 Traitements anti-inflammatoires .....	24
2.1.1.1 Glucocorticoïdes stéroïdiens .....	24
2.1.1.2 Immunomodulateurs.....	24
2.1.2 Surexpression d'utrophine.....	25
2.1.3 Augmentation de la masse musculaire .....	25
2.1.4 Translecture du codon stop .....	26
2.2 Thérapie génique.....	27

2.2.1	Expression de mini- et micro-dystrophine .....	27
2.2.1.1	Lentivirus .....	27
2.2.1.2	Virus associés aux adénovirus (AAV) .....	27
2.2.2	Saut d'exon .....	28
2.3	Thérapie cellulaire .....	30
2.3.1	Définition d'une cellule souche.....	30
2.3.1.1	Classification des cellules souches .....	31
2.3.2	Critères d'un candidat à la thérapie cellulaire de la DMD .....	33
2.3.3	Deux grandes familles de cellules souches au potentiel myogénique .....	33
2.3.3.1	Cellules pluripotentes.....	33
A.	Cellules souches embryonnaires (ES) .....	33
B.	Cellules pluripotentes induites (iPS) .....	34
2.3.3.2	Cellules souches adultes.....	35
A.	Présentation des populations cellulaires candidates .....	35
B.	Précurseurs myogéniques : Les cellules satellites et leurs descendants les myoblastes .....	37
C.	Cellules souches extraites du muscle .....	40
D.	Cellules non résidentes du muscle .....	47
2.3.4	Impact de la niche sur le comportement de la cellule souche.....	50
2.3.4.1	Niche satellitaire.....	50
2.3.4.2	Facteurs environnementaux.....	53
A.	Réponse aux cytokines/chemokines .....	53
B.	Réponse au stress oxydatif .....	53
C.	Impact de la teneur en oxygène .....	54
<b>Chapitre 3. Outils d'exploration par des approches à haut débit .....</b>		<b>59</b>
3.1	Apport des approches « haut débit » .....	59
3.1.1	Etudes « omiques » et physiopathologie de la DMD .....	59
3.1.1.1	Homéostasie ionique.....	59
3.1.1.2	Métabolisme.....	60
3.1.1.3	Réponse inflammatoire/apoptose .....	60
3.1.1.4	Régénération .....	61
3.1.2	Etude des miRNAs dans le muscle squelettique .....	62
3.1.2.1	Définition des miRNAs.....	62
3.1.2.2	miRNAs musculaires .....	63
3.1.2.3	miRNAs dans les dystrophies musculaires .....	65
3.2	Biomarqueurs circulants.....	67
3.2.1	miRNAs circulants .....	67
3.2.2	Autres biomarqueurs circulants.....	69

## **PARTIE EXPERIMENTALE .....73**

### **Chapitre 1. Exploration des conséquences tissulaires de l'apport de cellules MuStem et recherche de biomarqueurs.....75**

1.1 Profil moléculaire du muscle squelettique de chien GRMD après administration systémique de cellules MuStem.....	75
1.1.1 Positionnement.....	75
1.1.2 Matériel et méthodes .....	76
1.1.2.1 Animaux.....	76
1.1.2.2 Traitement immunosuppresseur.....	76
1.1.2.3 Préparation des échantillons d'ARN totaux déposés sur puce.....	77
1.1.2.4 Hybridation sur la puce canine d'expression génique.....	77
1.1.2.5 Analyse des données d'expression .....	77
1.1.2.6 Validations par RT-qPCR .....	78
1.1.3 Résumé des résultats obtenus .....	78
1.1.4 Article.....	79
1.1.5 Discussion.....	127
1.2 miRNAs chez le chien GRMD et impact de la transplantation de cellules MuStem .....	132
1.2.1 Positionnement.....	132
1.2.2 Matériel et méthodes .....	133
1.2.2.1 Animaux.....	133
1.2.2.2 Prélèvements musculaires.....	133
1.2.2.3 Extraction des ARNs et qPCR .....	133
1.2.2.4 Hybridation <i>in situ</i> .....	133
1.2.2.5 Analyses statistiques .....	134
1.2.3 Résumé des résultats .....	134
1.2.4 Article.....	135
1.2.5 Etude complémentaire : miRNAs circulants.....	163
1.2.5.1 Matériel et Méthodes .....	163
A. Préparation des sérums.....	163
B. Extraction des ARNs .....	163
C. qPCR .....	163
1.2.5.2 Résultats .....	164
1.2.6 Discussion.....	165

### **Chapitre 2. Cellules MuStem : définition de l'agent humain et capacités de réponse aux changements environnementaux.....167**

2.1 Caractérisation des cellules MuStem humaines.....	167
---	-----

2.1.1	Positionnement.....	167
2.1.2	Matériel et méthodes .....	168
2.1.2.1	Différents types cellulaires .....	168
2.1.2.2	Extraction des ARNs totaux et transcription inverse (RT) .....	168
2.1.2.3	PCR et q-PCR en temps réel.....	169
2.1.2.4	Immunocytochimie.....	170
2.1.3	Présentation des résultats .....	171
2.1.3.1	Expression de marqueurs de pluripotence.....	171
2.1.3.2	Expression des facteurs de régulation myogéniques .....	173
2.1.4	Discussion.....	175
2.2	Etude de l'impact de l'environnement sur les cellules MuStem .....	178
2.2.1	Positionnement.....	178
2.2.2	Matériel et méthodes .....	179
2.2.2.1	Etude comparée du potentiel de survie des cellules MuStem et myoblastes en présence d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	179
	A. Culture cellulaire .....	179
	B. Test de survie en présence d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	179
	C. Tests statistiques .....	180
2.2.2.2	Etude des cellules MuStem en condition hypoxique .....	180
	A. Mise en culture des cellules MuStem en conditions normoxique et hypoxique .....	180
	B. Suivi dans le temps des cultures.....	180
	C. RT-Qpcr .....	181
2.2.3	Présentation des résultats .....	182
2.2.3.1	Etude comparée du potentiel de survie à un stress oxydatif : cellules MuStem vs myoblastes .....	182
2.2.3.2	Etude des cellules MuStem en condition hypoxique .....	187
	A. Morphologie des cellules MuStem .....	187
	B. Prolifération.....	188
2.2.3.3	Etude transcriptionnelle : hypoxie vs normoxie .....	191
2.2.4	Discussion.....	193
	<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>199</b>
	<b>REFERENCES .....</b>	<b>203</b>
	<b>ANNEXES.....</b>	<b>249</b>

## Table des figures

<b>Figure 1</b>	Signe de Gowers .....	9
<b>Figure 2</b>	Complexe protéique associé à la dystrophine (DAPC).....	12
<b>Figure 3</b>	Conséquences primaires de l'absence de dystrophine dans le muscle.....	14
<b>Figure 4</b>	Lésions histologiques caractéristiques du chien GRMD .....	21
<b>Figure 5</b>	Stratégies thérapeutiques de la DMD.....	23
<b>Figure 6</b>	Hierarchie des cellules souches.....	31
<b>Figure 7</b>	Classement des différentes cellules souches au potentiel myogénique selon leur origine .....	36
<b>Figure 8</b>	Programme de détermination et de différenciation des cellules satellites régi par l'expression de facteurs de transcription et régulation myogénique (MRF).....	37
<b>Figure 9</b>	Profil d'expression des cellules satellites.....	38
<b>Figure 10</b>	Identification des populations à l'issu du protocole de préplating.....	46
<b>Figure 11</b>	Isolement de cellules souches et progéniteurs cellulaires dérivés du muscle squelettique humain (MDSPC) .....	47
<b>Figure 12</b>	Niche des cellules satellites.....	52
<b>Figure 13</b>	Tension en oxygène dans divers compartiments de cellules souches .....	55
<b>Figure 14</b>	Hypothèse de la niche hypoxique .....	56
<b>Figure 15</b>	Effets de l'hypoxie décrits sur les cellules souches mésenchymateuses .....	57
<b>Figure 16</b>	miRNAs dans le développement musculaire .....	64
<b>Figure 17</b>	Modèle reliant la dystrophine à l'expression des miRNAs.....	66
<b>Figure 18</b>	Stratégie de recherche de biomarqueurs sériques de la DMD par une approche protéomique .....	70
<b>Figure 19</b>	Niveaux d'expression des myomiRs dans le sérum de chiens GRMD et GRMD <sup>MuStem</sup> en comparaison aux chiens sains. ....	164
<b>Figure 20</b>	Expression des marqueurs de pluripotence et d'auto-renouvellement par RT-PCR .....	171

<b>Figure 21</b>	Expression relative du facteur de transcription Klf4 par RT-qPCR .....	172
<b>Figure 22</b>	Immunomarquage des marqueurs de pluripotence et d'auto-renouvellement ....	173
<b>Figure 23</b>	Expression des facteurs de régulation myogénique par RT-PCR.....	174
<b>Figure 24</b>	Morphologie des cellules après 48H en présence d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	182
<b>Figure 25</b>	Prolifération cellulaire et survie des cellules soumises à un stress oxydatif induit à l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	183
<b>Figure 26</b>	Pourcentages moyennés de survie des cellules MuStem et myoblastes après exposition à l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en fonction du temps .....	184
<b>Figure 27</b>	Comparaison de la survie cellulaire des cellules MuStem par rapport aux myoblastes après exposition à 100 ou 200 µM d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , à 24, 48 et 72 heures ...	186
<b>Figure 28</b>	Morphologie des cellules MuStem en conditions normoxique (20% O <sub>2</sub> ) et hypoxiques (5% et 1% O <sub>2</sub> ).....	187
<b>Figure 29</b>	Courbes de prolifération des cellules MuStem en conditions normoxique (20% O <sub>2</sub> ) et hypoxiques (5% et 1% O <sub>2</sub> ) .....	189
<b>Figure 30</b>	Modifications transcriptionnelles des cellules MuStem après 5 jours en conditions hypoxiques (5% et 1% O <sub>2</sub> ).....	192

## **Table des tableaux**

<b>Tableau 1</b>	Liste des amorces utilisées pour les RT-PCR et qPCR en temps réel .....	169
<b>Tableau 2</b>	Liste des amorces utilisées pour les RT-PCR et qPCR en temps réel .....	181
<b>Tableau 3</b>	Facteurs d'amplification des cellules obtenues entre les conditions hypoxiques et normoxique .....	190



# **Avant-propos**



La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique héréditaire qui affecte l'ensemble des muscles du corps humain. C'est la plus commune des dystrophies musculaires mais aussi la plus grave. Son incidence est d'environ un garçon sur 3500 chez les nouveaux nés. Elle se traduit par un affaiblissement musculaire progressif qui aboutit à la perte de la marche vers 10 ans et l'espérance de vie des patients atteints de la DMD ne dépasse guère 25 ans. Les patients sont souvent placés sous traitement anti-inflammatoire et principalement sous corticothérapie afin d'améliorer leur confort de vie mais il n'existe, à ce jour, aucun traitement curatif. La recherche poursuit donc ses efforts dans le développement de stratégies thérapeutiques parmi lesquelles la thérapie génique et la thérapie cellulaire. Ces dernières visent à apporter soit un gène normal ou tronqué codant une copie fonctionnelle de la protéine manquante soit une cellule saine ou corrigée *ex vivo* au muscle malade dans le but de pouvoir maintenir son intégrité. La thérapie cellulaire tend à délivrer des noyaux normaux dans les fibres musculaires dystrophiques, en utilisant le phénomène de fusion qui intervient naturellement lors de la régénération musculaire. L'enjeu consiste à identifier la population cellulaire idéale pour la thérapie des myopathies.

Ces dernières années, l'UMR 703 PAnTher a identifié une population de cellules souches résidentes du tissu musculaire, nommées MuStem, qui a montré la preuve de son efficacité thérapeutique dans un modèle canin de la DMD (Rouger et al., 2011). Injectées par voie générale chez le chien dystrophinopathe, ces cellules permettent une amélioration clinique majeure et persistante ainsi qu'une limitation des altérations du tissu musculaire. Cette population cellulaire se positionne ainsi comme candidate à la thérapie cellulaire de la DMD. Pour déterminer si ce candidat cellulaire peut réellement aboutir à la présentation d'un produit thérapeutique, l'UMR a engagé un programme de recherche dévolue à l'isolement et la caractérisation des cellules MuStem chez l'Homme.

Ma thèse universitaire s'est structurée autour de deux axes principaux. Le premier axe a eu pour objectif d'explorer les muscles de chiens dystrophiques transplantés avec les cellules MuStem canines isolées au laboratoire afin, d'une part, d'approfondir notre niveau de compréhension sur les mécanismes mis en jeu par le traitement et, d'autre part, de rechercher des biomarqueurs de son efficacité. Le second axe a visé à apporter des éléments à la caractérisation des cellules MuStem humaines nouvellement isolées dans l'UMR sur la base du protocole développé pour l'isolement des cellules canines, autrement dit participer à leur

définition. Cette deuxième partie a ainsi portée sur la recherche de marqueurs permettant d'identifier cette population de cellules souches mais également sur l'étude de sa capacité de réponse aux changements environnementaux.

Ce manuscrit est constitué de deux parties. La première est une revue bibliographique présentant la pathologie DMD et ses modèles animaux, les différentes stratégies thérapeutiques mises en place dont la thérapie cellulaire fait partie et l'apport des approches haut débit dans l'identification de mécanismes physiopathologiques et de biomarqueurs. La seconde partie repose sur la présentation de mes travaux expérimentaux regroupés selon les deux axes de la thèse précédemment décrits. Les résultats obtenus seront présentés et discutés pour chacune des études constituant les axes. J'évoquerai également les perspectives qui en émanent. Une conclusion générale viendra conclure le présent manuscrit.

# **Introduction bibliographique**



# Chapitre 1. La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD)

## 1.1 Généralités

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) a été rapportée pour la première fois par Edwar Meryon en 1851. Elle a ensuite été décrite plus précisément en 1861 par le physiologiste Guillaume Duchenne de Boulogne qui rapporta le cas du patient Joseph Sarazinen (Tyler, 2003).

La DMD représente la forme la plus fréquente et la plus sévère des dystrophies musculaires. C'est une pathologie héréditaire et récessive, liée au chromosome X, qui touche un garçon nouveau-né sur 3500 (Emery, 1991). Elle se caractérise par la perte progressive à la fois de la masse et de la fonction musculaires.

Une ou plusieurs mutations du gène *DMD* codant la dystrophine est à l'origine des dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker (BMD) (Hoffman et al., 1987). Le gène *DMD* a été identifié en 1986 par une approche de clonage positionnel. Localisé sur le chromosome X (Xp21.2), ce gène s'étend sur un territoire génomique de 2,6 millions de paires de bases (pb) ce qui correspond à environ 0,1% du génome et approximativement 1,5% du chromosome X (Koenig et al., 1987; Monaco et al., 1986). Le gène est organisé en 79 exons séparés par des introns de taille très variable et il existe de multiples promoteurs et isoformes résultant d'épissages alternatifs (Ahn and Kunkel, 1993). L'expression des isoformes les plus longues de dystrophine est contrôlée par trois promoteurs localisés dans la région 5' du gène qui sont actifs dans les neurones (promoteur du cerveau B, Dp427b), dans les muscles striés, cardiaques et les muscles lisses (promoteur M, Dp427m) et dans les cellules de Purkinje localisées dans le cerveau (promoteur P, Dp427p). La grande taille du gène *DMD* contribue significativement au taux élevé de mutations spontanées ou *de novo* (1 pour 10 000 gamètes). Les anomalies du gène *DMD* peuvent être des mutations, des délétions, des insertions ou bien des duplications. Quand la mutation aboutit à une rupture du cadre de lecture, la protéine dystrophine alors absente engendre un phénotype sévère DMD. Une mutation qui maintient le cadre de lecture permet la production d'une dystrophine tronquée mais fonctionnelle et donne lieu à un phénotype moins sévère dit de type Becker (Becker and Kiener, 1955). Cette théorie de l'interruption du cadre de lecture permet d'expliquer environ 90% des cas de DMD et BMD (Koenig et al., 1989; Monaco et al., 1988; Yang et al., 2013). Les mutations surviennent principalement dans deux « points chauds » situés dans les régions

des exons 3-7 (environ 20% des cas) et des exons 45-55 (60 à 80% selon les études) du gène *DMD*. Environ 60 à 70% des mutations du gène *DMD* sont attribuées à de larges délétions, 10% à de grandes duplications (Dent et al., 2005; Prior and Bridgeman, 2005; Wulff et al., 1989; Yang et al., 2013).

## 1.2 Manifestations cliniques

Un garçon atteint de myopathie de Duchenne présente en général peu de signes de la maladie avant l'âge de 3 ans (Iwańczak et al., 2000). Il marche parfois tard, tombe assez souvent et se relève difficilement. Une hypertrophie de certains muscles comme les mollets est observée et une rétraction qui touche les tendons d'Achille entraîne un déplacement sur la pointe des pieds (Beenakker et al., 2002).

Au fil des années se développe une faiblesse musculaire progressive des membres et du tronc (Emery, 1989, 2002). La montée des escaliers, puis la marche vers 10-12 ans, deviennent impossibles et l'utilisation des membres supérieurs se limite progressivement (Wicklund, 2013). En général, le recours occasionnel au fauteuil roulant est nécessaire vers l'âge de 8-9 ans, puis son utilisation devient définitive au début de l'adolescence. Une scoliose souvent grave se développe, parfois avant, mais le plus souvent après la perte de la marche (McDonald et al., 1995). L'atteinte des muscles respiratoires donne lieu à une hypoventilation alvéolaire et rend l'enfant particulièrement sensible aux infections broncho-pulmonaires (Simonds, 2002). L'atteinte simultanée des muscles squelettique et cardiaque n'est pas rare, entre 65% et 95% des cas après 21 ans (Angelini et al., 1996). Deux types de symptômes cardiaques peuvent exister. Les premiers sont liés à une dilatation du ventricule gauche : anomalie morphologique du tracé électrocardiographique, trouble du rythme cardiaque et trouble de la conduction, dilatation du ventricule gauche avec réduction de la fraction d'éjection. Les secondes plus rares sont liées à une cardiomyopathie dilatée responsable avant 20 ans d'une insuffisance congestive fatale (Towbin, 1998). Trente pourcent des patients environ présentent un retard mental, objectivé par un quotient intellectuel moyen de 80 (Boyce et al., 1991). Certains signes relevant d'un trouble musculaire lisse digestif sont également reportés (dysphagie, vomissement, constipation chronique, dilatations gastriques aiguës).

Les signes cliniques recherchés lors du diagnostic sont un dandinement à la marche qui traduit une faiblesse de la ceinture scapulaire, une hyperlordose lombaire et le signe de Gowers (Figure 1) qui correspond à une obligation du patient à prendre appui avec ses mains

sur ses cuisses pour se relever de la station assise. En complément de l'examen clinique, des examens de laboratoire permettent de préciser le diagnostic. On recherchera notamment à doser la créatine kinase (CK) sérique. Cette enzyme musculaire est libérée dans le sérum en cas de lésions. Le taux de CK chez les patients DMD est considérablement augmenté dès la naissance, atteignant jusqu'à 100 fois celui d'un sujet sain. L'examen histologique d'une biopsie musculaire permet également de constater les lésions éventuelles et de déterminer la quantité de dystrophine exprimée. Certains médecins recommandent un électromyogramme, qui consiste en un enregistrement des courants électriques qui traduisent l'activité musculaire. Il ne permet cependant pas à lui seul de discriminer la DMD d'une autre pathologie musculaire.

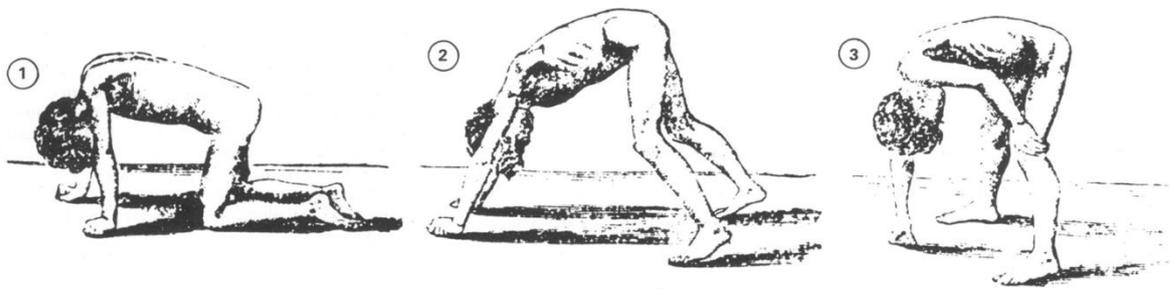


Figure 1 **Signe de Gowers**

Le signe de Gowers est un signe clinique indiquant une parésie de la musculature proximale des membres inférieurs. Il désigne un patient qui est obligé de se servir, en plusieurs étapes, de ses mains et de ses bras pour passer de la position agenouillée à la position debout, en raison du manque de force des muscles des hanches et des cuisses. ("Pseudo-hypertrophic muscular paralysis. A clinical lecture", William Richard Gowers (1879))

Le diagnostic moléculaire peut être porté par différentes techniques. Deux kits PCR multiplexe de neuf exons chacun ont été successivement développés et permettent à eux deux de détecter 97% des délétions de patients DMD (Beggs et al., 1990; Chamberlain et al., 1988). Pour la recherche de délétions et de duplications, une technique nommée MLPA (Multiplex Ligation-Dependant Probe Amplification) permet de cribler simultanément les 79 exons du gène (Lalic et al., 2005). Il est également possible de séquencer le gène *DMD* comme cela a été réalisé par la méthode de Sanger, en combinaison avec la MLPA, sur une cohorte de 407 patients DMD/BMD pour détecter des mutations ponctuelles (Chen et al., 2013).

## 1.3 Dystrophine et complexe protéique associé

### 1.3.1 Dystrophine

#### 1.3.1.1 Structure de la dystrophine

La dystrophine est une protéine du cytosquelette de 427 kDa qui est organisée en 4 domaines majeurs (Koenig et al., 1988; Le Rumeur et al., 2010).

- La région N-terminale de la dystrophine, composée de plus de 240 acides aminés, constitue le domaine de liaison à l'actine.
- Le domaine central de type triple hélice, similaire à la spectrine, se compose de 24 motifs répétés et de 4 régions charnières riches en résidus proline qui confèrent sa forme de bâtonnet et sa flexibilité à la protéine dystrophine. Certains motifs répétés du domaine central peuvent interagir avec les phospholipides membranaires (Le Rumeur et al., 2003, 2007).
- Le troisième domaine est constitué d'un domaine WW et d'une région riche en cystéines. Le domaine WW, petit motif en feuillet  $\beta$ , reconnaît les régions riches en prolines et est impliqué dans la signalisation intracellulaire. Il se lie au  $\beta$ -dystroglycane ( $\beta$ -DG), qui fait le lien transmembranaire entre les protéines intracellulaires et extracellulaires. La région riche en cystéines, de plus de 280 acides aminés, renferme deux motifs EF de fixation au calcium et un site potentiel de fixation au zinc ZZ.
- Le domaine C-terminal, composé de 320 acides aminés, est une hélice  $\alpha$  qui contient des sites de fixation à la dystrobrevine, aux syntrophines, à l'actine et interagit également avec le  $\beta$ -DG.

#### 1.3.1.2 Rôles de la dystrophine

La dystrophine est localisée au niveau de la face cytoplasmique du sarcolemme. Elle est liée à la matrice extracellulaire (MEC) par un complexe protéique et au cytosquelette d'actine par son domaine N-terminal. Elle a un rôle structural, en assurant la stabilité de la membrane et la transduction de la force durant la contraction musculaire. La dystrophine permet d'absorber les chocs et de maintenir l'intégrité du sarcolemme lors de stress mécaniques afin d'éviter des ruptures de la membrane et les fuites non spécifiques d'ions ou autres composants cellulaires (Sarkis et al., 2013). L'hypothèse « mécanique » de la DMD est que l'absence de dystrophine et du lien entre la MEC et le cytosquelette pourrait être à l'initiative

de la nécrose cellulaire progressive, par sur-activation de protéases dépendantes du calcium. L'utrophine (dystrophin-related protein), qui présente une très forte homologie de séquence avec la dystrophine et des similarités structurelles (Tinsley et al., 1992), peut aussi permettre une protection mécanique du muscle squelettique. Au cours du développement embryonnaire du tissu musculaire, l'utrophine est présente tout le long du sarcolemme mais son expression se restreint aux jonctions myotendineuses et neuromusculaires à partir de la période postnatale. L'expression d'utrophine s'étend à tout le sarcolemme sur les fibres musculaires en régénération et sur une partie au moins des fibres matures dans les muscles des patients DMD (Helliwell et al., 1992; Shim and Kim, 2003).

### 1.3.2 Complexe dystrophine-glycoprotéines associées

Au niveau du sarcolemme, la dystrophine fait partie d'une structure macromoléculaire de protéines appelée « complexe associé à la dystrophine » ou « Dystrophin-Associated Protein Complex » (DAPC) ou bien également connue sous le nom de « Dystrophin-associated Glycoprotein Complex » (DGC) (Ervasti and Campbell, 1991) (Figure 2). Ce complexe comprend un complexe de sarcoglycanes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ), un complexe de dystroglycanes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), et un complexe cytoplasmique comprenant la dystrobrevine, les syntrophines ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), la sarcospane. La dystrophine est liée au cytosquelette intracellulaire via son extrémité N-terminale qui est associée aux filaments d'actine tandis que son extrémité C-terminale interagit avec les membres du DAPC notamment le  $\beta$ -DG. D'autres protéines sont également associées au complexe, telles que la nNOS (neuronal Nitric Oxide Synthase) et la cavéoline 3.

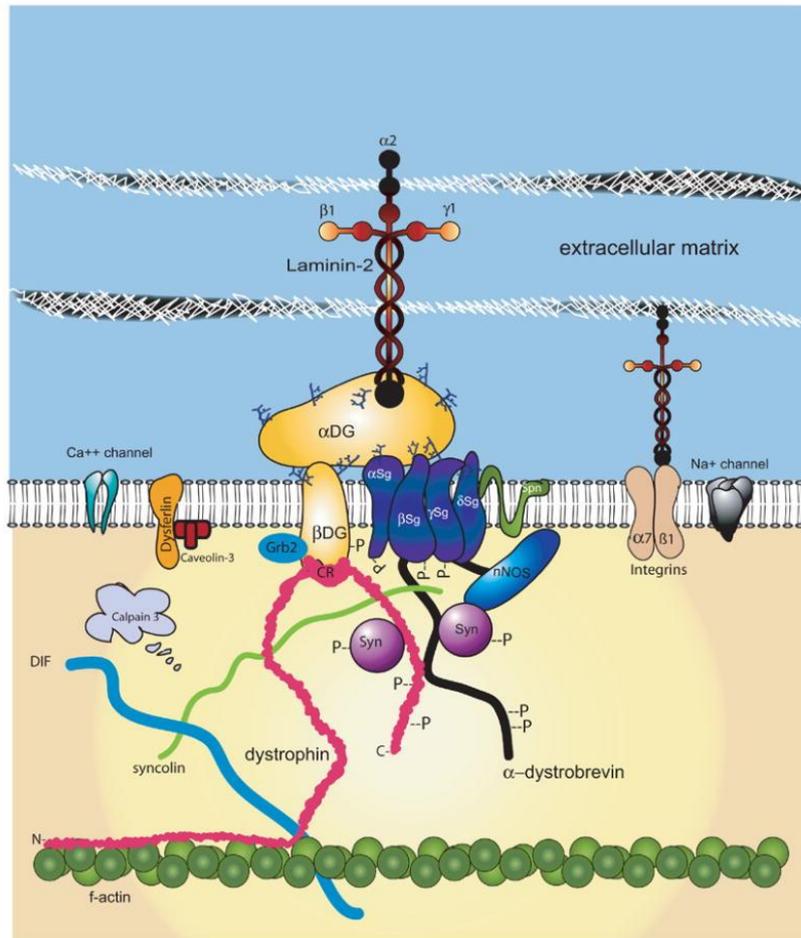


Figure 2 **Complexe protéique associé à la dystrophine (DAPC)**

Le DAPC comprend des composants constitutifs (la dystrophine, des protéines associées au sarcolemme:  $\alpha$ ,  $\beta$ -dystroglycanes (DG), les  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$ -sarcoglycanes (SG), l' $\alpha$ -dystrobrevine, les syntrophines, la sarcospane (Spn)), un ligand extracellulaire (laminine-2), des partenaires intracellulaires (filaments d'actine, filaments intermédiaires de la desmine ; DIF). Par l'intermédiaire de ces protéines, le complexe est un lien avec l'oxyde nitrique synthétase neuronale (nNOS), un certain nombre de canaux cationiques et la syncoiline. (Odom et al., 2007)

### 1.3.3 Conséquences de l'absence de dystrophine

On retrouve sur les biopsies musculaires de patients DMD des fibres musculaires en nécrose ou régénération qui sont souvent regroupées en foyers. Les fibres nécrotiques sont entourées de macrophages et lymphocytes  $CD4^+$  et la régénération se manifeste par la présence de fibres centro-nucléées qui reflètent l'activité des myoblastes. Au cours de l'évolution de la maladie, les fibres musculaires sont progressivement remplacées par du tissu fibreux et adipeux (Deconinck and Dan, 2007).

La physiopathologie de la DMD est complexe et toutes les conséquences fonctionnelles et moléculaires de l'absence de la protéine dystrophine dans le muscle des patients DMD ne

sont pas encore clairement identifiées. Cependant, nous pouvons distinguer des conséquences primaires, qui sont à l'origine de l'hypothèse mécanistique de la maladie, ainsi que des conséquences secondaires.

#### 1.3.3.1 Conséquences primaires

La dystrophine stabilise le sarcolemme et le protège des forces mécaniques lors des contractions musculaires. Dans un muscle dystrophique, son absence entraîne une déstabilisation du complexe DAPC et aboutit à une perte de l'intégrité du sarcolemme avec une augmentation de sa perméabilité (Judge et al., 2006; Petrof et al., 1993; Sacco et al., 1992). Il s'en suit une augmentation du flux calcique qui engendre une perturbation de l'homéostasie calcique (Franco and Lansman, 1990). Cet influx calcique est majoritairement médié par les canaux TRPC (Transient Receptor Potential Canonical) (Vandebrouck et al., 2002). Suite à l'augmentation de calcium cytosolique, il se produit une activation des protéases et plus particulièrement des calpaïnes, calcium-dépendantes, qui vont dégrader les protéines et notamment des protéines contractiles et du cytosquelette (Figure 3). Suite à l'augmentation de la perméabilité membranaire, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), est augmentée. Ces ROS produites peuvent activer les canaux calciques ou bien activer des voies de signalisation notamment de l'inflammation telles que celles impliquant le NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B). Ces événements directement liés à l'absence de dystrophine vont aboutir à une nécrose des fibres musculaires et une atrophie musculaire.

#### 1.3.3.2 Conséquences secondaires

Le complexe DAPC interagit avec de nombreuses protéines qui jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire telles que la protéine Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2), nNOS, les MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases), la calmoduline, la cavéoline-3 (Rando, 2001). Il est nécessaire de considérer les dérégulations de la signalisation cellulaire qui ont lieu au cours de la DMD et l'utilisation d'approches « omiques » a permis ces dernières années de préciser les modifications transcriptomiques et protéomiques des tissus dystrophiques. Ce point sera plus amplement détaillé dans le paragraphe 3.1.

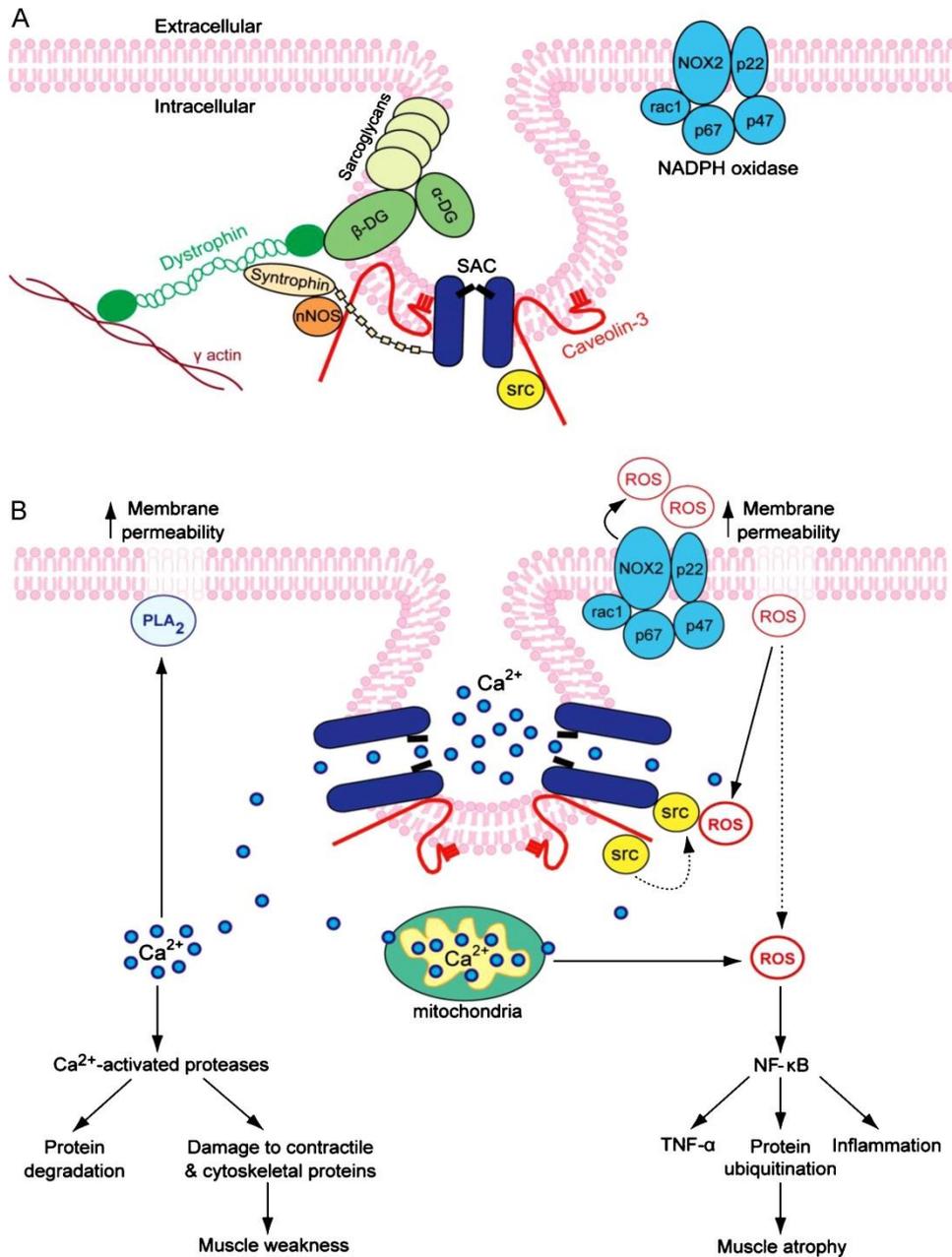


Figure 3 **Conséquences primaires de l'absence de dystrophine dans le muscle**

(A) Muscle normal ; (B) Voies activées dans le muscle dystrophique conduisant à l'atrophie et à la faiblesse musculaire. DG : Dystroglycanes, nNOS : neuronal nitric-oxid synthase, NOX2 : unité catalytique de la NADPH oxydase et sous-unités associées, PLA2 : phospholipase A2, ROS : reactive oxygen species, SAC : stretch-activated channel. (Allen and Whitehead, 2011)

## 1.4 Modèles animaux de la DMD

L'American National Research Council Committee on Animal Models for Research and Aging propose de définir un modèle animal comme étant « un modèle permettant l'étude des données de référence sur la biologie ou le comportement, ou chez lequel on peut étudier un processus pathologique spontané ou induit, celui-ci ayant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'humain ou d'autres espèces animales ». Les modèles animaux peuvent être classifiés de la manière suivante :

- Les modèles spontanés où les maladies ou conditions sont naturellement présentes chez les animaux et identiques à des maladies ou affections humaines ;
- Les modèles expérimentaux chez lesquels les scientifiques reproduisent une affection ou une maladie comme par exemple les modèles génétiquement modifiés.

Les modèles animaux apparaissent nécessaires à l'étude des mécanismes physiopathologiques mais également aux études d'efficacité et de toxicité de thérapies potentielles qui sont indispensables avant la mise en place d'essais cliniques. Un modèle animal pertinent devra donc permettre de prévoir, et ce de manière fiable, l'effet qu'aura une intervention thérapeutique chez l'Homme. Une connaissance approfondie des caractéristiques pathologiques de l'animal modèle est donc primordiale et dans le cas de maladies génétiques, l'anomalie génétique doit être comparable à celle des patients.

### 1.4.1 Modèles rongeurs

Divers modèles murins avec des mutations sur le gène *DMD* ont été identifiés dont le modèle le plus largement utilisé, la souris X-linked muscular dystrophy mouse (*mdx*) (Coulton et al., 1988). Des souris doubles mutantes ont également été produites pour tester des hypothèses physiopathologiques et modifier le phénotype *mdx*.

#### 1.4.1.1 Souris *mdx*

Une mutation spontanée du gène *DMD* a pour la première fois été décrite en 1984 dans une colonie de souris C57BL/10ScSnJ (Bulfield et al., 1984). Cette souris est désormais nommée C57BL/10ScSn-Dmd<sup>mdx</sup> ou plus couramment, souris *mdx*. Elle porte une mutation dans l'exon 23 du gène de la dystrophine introduisant un codon stop prématuré.

La dégénérescence musculaire de la souris *mdx* diffère de celle des patients DMD puisqu'elle arrive par vagues et non de manière continue. La nécrose avec infiltration de

neutrophiles et macrophages apparaît vers 2 semaines d'âge et des cycles de dégénérescence et régénération des fibres musculaires sont observés à l'âge de 2-4 semaines, consistant en une augmentation du nombre de myofibres nouvellement formées et de l'hétérogénéité de la taille des fibres. Les muscles présentent des cycles de nécrose et régénération durant toute la durée de vie de la souris, cependant ce phénomène ralentit et devient plus modéré après 12 semaines. Par conséquent, la perte de la masse musculaire est lente et la faiblesse musculaire des souris en cage ne se manifeste pas avant un âge avancé (Lefaucheur et al., 1995). La fibrose dans la plupart des muscles de la souris *mdx* est beaucoup moins prononcée que chez les patients DMD à l'exception du diaphragme (Stedman et al., 1991). La pathologie musculaire de la souris *mdx* peut être aggravée par de l'exercice forcé ; cette méthode permettant une meilleure évaluation de l'efficacité de thérapies expérimentales (Granchelli et al., 2000; Vilquin et al., 1998).

Quatre souches additionnelles que sont les souris *mdx2cv*, *mdx3cv*, *mdx4cv* et *mdx5cv* (Im et al., 1996) ont également été générées et présentent des mutations différentes de la souris *mdx* originale tout en conservant un phénotype similaire.

#### 1.4.1.2 Souris doubles mutantes

Le croisement entre le mutant *mdx* et le mutant dépourvu d'utrophine (*utr*<sup>-/-</sup>), effectué parallèlement par une équipe anglaise (Deconinck et al., 1997) et une équipe américaine (Grady et al., 1997), permet de générer des doubles mutants *mdx ; utr*<sup>-/-</sup> présentant une forme sévère de la maladie, comparable à la DMD chez l'Homme. Ces animaux développent une dégénérescence musculaire débutant plus tôt que la souris *mdx* et qui aboutit à des déformations squelettiques majeures de type cyphose prononcée, une cardiomyopathie ainsi qu'une mort prématurée entre 4 et 14 semaines (Janssen et al., 2005). Les souris *mdx ; utr*<sup>-/-</sup> développent aussi de nombreux changements dégénératifs (osseux, du cartilage, des disques intervertébraux) et leurs fibres musculaires présentent plus d'altérations persistentes du couplage excitation/contraction que celles des souris *mdx* (Capote et al., 2010; Isaac et al., 2013). A la lumière de ce croisement, il apparaît donc que l'utrophine est capable de compenser le déficit en dystrophine de la souris *mdx* dans le muscle squelettique et le coeur.

Parmi les souris double mutantes, notons les souris *mdx ; MyoD*<sup>-/-</sup> pour lesquelles le gène codant MyoD, un facteur de régulation myogénique important dans la différenciation musculaire, est inactivé. Ce croisement a été réalisé dans le but d'obtenir des souris ayant des capacités de régénération réduites (Megeney et al., 1996). Ces souris montrent une diminution

de leur activité accompagnée d'une perte de poids et développent une cardiomyopathie avec des foyers de nécrose à l'âge de 10 mois (Megeny et al., 1999). Leur espérance de vie est également diminuée (12 mois).

Les souris *mdx ; adbn<sup>-/-</sup>* présentent une absence de la protéine  $\alpha$ -dystrobrevine impliquée dans la stabilisation du DAPC (Grady et al., 1999). Elles ont une espérance de vie réduite de 8 à 10 mois et présentent des lésions musculaires modérées : nécrose musculaire, inflammation, fibrose, anisocytose et présence importante de fibres centronucléées.

Une souris double mutante pour l'intégrine  $\alpha 7 \beta 1$  et la dystrophine (*mdx ;  $\alpha 7$  integrin<sup>-/-</sup>*) a également été générée pour étudier le lien de cette intégrine exprimée dans le muscle squelettique avec le complexe DAPC dans la connexion de la MEC au cytosquelette (Guo et al., 2006). Ce modèle ne présente pas un phénotype différent des souris *mdx* à la naissance mais ces souris meurent prématurément à 24-28 jours d'insuffisances cardiaque et respiratoire. Histologiquement, une perte du nombre de fibres associée à une réduction de leur taille ainsi qu'une faible quantité de fibres centronucléées suggèrent une faible activité de régénération. L'intégrine  $\alpha 7$  pourrait avoir un rôle compensateur dans un muscle déficient en dystrophine (Burkin et al., 2001).

Dans le but d'étudier l'impact des fortes concentrations de parvalbumine retrouvées dans les muscles squelettiques murins, des souris *mdx ; PV<sup>-/-</sup>* ont été créées et il s'avère que ces souris sont très proches des souris *mdx* (Raymackers et al., 2003).

Un nouveau modèle de souris *mdx* double mutante, déficiente pour *Cmah*, a récemment été généré par introduction d'une mutation similaire à celle de l'Homme dans le gène *Cmah* (Chandrasekharan et al., 2010). Ce gène code chez la souris une enzyme qui permet de produire un monosaccharide, le Neu5Gc. Comme l'Homme, les souris *mdx* KO pour *Cmah* ne possèdent pas le Neu5Gc, ce qui entraîne une diminution de la liaison des glycoprotéines associées à la dystrophine à la MEC. Ces souris développent les symptômes plus précocément et plus sévèrement que les souris *mdx*. Leur espérance de vie est réduite par rapport à celle des souris *mdx*. Une augmentation importante de la fibrose est observée dans le quadriceps des souris *mdx* KO pour *Cmah* à 6 semaines d'âge et l'étendue de la fibrose dans le diaphragme à 6 mois est augmentée par rapport aux souris *mdx*. Des foyers nécrotiques sont également observés dans le cœur à partir de 3 mois.

L'évaluation *in vivo* de stratégies de thérapie cellulaire nécessite des modèles animaux capables de tolérer la xénogreffe. Ainsi, plusieurs modèles de souris *mdx* immunodéficientes

ont été générés: *nude/mdx* (Morgan et al., 1993), *scid/mdx* (Torrente et al., 2004) et *Rag2/mdx* (Golubek et al., 2007). Plus récemment, des souris *Rag2<sup>-</sup> Il2rb<sup>-</sup> Dmd<sup>-</sup>*, ne présentant pas d'activité des cellules T, B et NK, ont été caractérisées (Vallese et al., 2013). Elles présentent des caractéristiques dystrophiques équivalentes aux souris *mdx* et peuvent permettre de suivre à long-terme le devenir de cellules myogéniques humaines.

#### 1.4.1.3 Rat *DMD<sup>mdx</sup>*

Un modèle de rat muté pour le gène *DMD* a récemment été généré par l'utilisation de TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) ciblant l'exon 23 (article accepté Larcher et al., 2014). Ces rats, KO pour la dystrophine et dénommés *DMD<sup>mdx</sup>*, présentent une importante nécrose et régénération des muscles à 3 mois. A 7 mois, les muscles montrent une fibrose sévère et une infiltration de tissu adipeux. Les rats *DMD<sup>mdx</sup>* ont une force musculaire diminuée et présentent également une atteinte cardiaque.

### 1.4.2 Modèles canins

Des mutations spontanées du gène de la dystrophine ont été décrites chez plusieurs races de chiens : le Golden Retriever (mutation ponctuelle dans l'intron 6), le Labrador Retriever (insertion entre les exons 19 et 20), le Rottweiler (mutation non-sens dans l'exon 58), le Braque Allemand (large délétion), le Welsh Corgi Pembroke (insertion d'une séquence répétée dans l'intron 13), le Cavalier King Charles (mutation faux-sens dans l'exon 50), le Cocker Spaniel (délétion dans l'exon 65) et le Terrier Tibétain (large délétion) (Kornegay et al., 2012).

Les modèles canins, qui présentent des caractéristiques cliniques plus sévères que celles de la souris *mdx* et plus similaires au phénotype DMD, sont souvent utilisés lors d'études précliniques. Le modèle le plus largement utilisé est le chien GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy).

#### 1.4.2.1 Chien GRMD

Le chien GRMD a été identifié en 1983 par Alexandre De Lahunta (Valentine et al., 1986) et caractérisé initialement en Caroline du Nord (Kornegay et al., 1988) et à l'Université de Cornell (Cooper et al., 1988), où a été fondée la première colonie, par croisement avec des chiens de diverses races. Tous les chiens GRMD ont donc un même ancêtre fondateur.

Dans ce modèle, l'absence de dystrophine est due à une mutation ponctuelle de l'intron 6 qui provoque le saut de l'exon 7 et l'apparition d'un codon stop anticipé dans l'exon 8 (Sharp et al., 1992). Plusieurs études ont permis d'établir les caractéristiques cliniques du chien GRMD (Ambrósio et al., 2008; Kornegay et al., 1988; Valentine et al., 1988).

#### A. Caractérisation et évolution clinique

Les signes cliniques apparaissent dès la naissance ; les chiots affectés ont une difficulté à téter et montrent un retard de croissance. Chez les chiens GRMD néonataux, les muscles fléchisseurs sont plus sévèrement atteints que les muscles extenseurs ce qui, probablement, est à corrélé à leur rôle dans la reptation. Dès l'âge de six mois, les chiens GRMD développent progressivement une démarche caractéristique. Ils adoptent une posture plantigrade liée à une hyper extension des articulations carpiennes et une flexion des articulations tibio-tarsiennes. Les muscles temporaux et du tronc sont atrophiés (Kornegay et al., 2012) tandis que le muscle sartorius est d'abord hypertrophié puis s'atrophie également à partir d'un an environ (Kornegay et al., 2003; Nghiem et al., 2013). Les chiens GRMD se caractérisent également par une laxité des muscles pharyngés accompagnée d'un excès de salivation et par une cyphose lombaire qui progresse en lordose (Kornegay et al., 2012). Des pneumonies par fausse déglutition surviennent fréquemment chez les chiens GRMD (jusqu'à 60% d'incidence) du fait de l'implication des muscles pharyngiens et oesophagiens. Des atteintes cardiaques peuvent également être observées, liées à une cardiomyopathie. Les chiens GRMD peuvent présenter des arythmies ventriculaires, une modification du tracé de l'électrocardiogramme (ECG) avec une augmentation de l'onde Q, une dilatation ventriculaire et une diminution de la fraction de raccourcissement (Moise et al., 1991). Une diminution du flux ventriculaire gauche est également visible par imagerie Doppler (Chetboul et al., 2004). Les modifications observées à l'ECG sont visibles dès 6 mois et progressent avec l'âge des chiens.

Les chiens GRMD montrent des variations phénotypiques importantes. Certains chiens perdent la marche à 6 mois ou bien meurent rapidement de complications respiratoires tandis que d'autres présentent un phénotype très modéré et conservent leur capacité ambulatoire jusqu'à l'âge de 10 ans (Ambrósio et al., 2008; Kornegay et al., 1994, 1999, 2003). Notons notamment le cas de Ringo, un chien GRMD présentant un phénotype clinique très modéré mais dont l'analyse histopathologique a révélé une atteinte tissulaire comparable à celle des

chiens GRMD au phénotype sévère avec notamment une absence de dystrophine, variabilité de la taille des fibres, dégénérescence et infiltration de tissu conjonctif.

## B. Phénotype tissulaire

Les fibres en cours de dégénérescence prennent l'aspect de fibres hyalines isolées. Les fibres nécrotiques, classiquement regroupées, sont fragmentées et font l'objet de dépôts calciques dans le sarcoplasme. Elles sont généralement entourées d'un infiltrat inflammatoire à cellules mononucléées. Les fibres en régénération, de petite taille et avec un important noyau central, se retrouvent en foyers, souvent proches des zones de nécrose. Une anisocytose qui est une association au sein du tissu de fibres hypertrophiques et de groupes de fibres en régénération est observée et la taille moyenne des fibres est globalement diminuée. Une fibrose secondaire endomysiale et pérимыsiale s'installe lentement autour de 4 mois environ, sans atteindre la sévérité observée chez le patient DMD à l'exception du diaphragme où elle est particulièrement sévère. Un tissu adipeux pérимыsial est parfois présent en quantité modérée, inférieure à celle observée chez le patient DMD. (Figure 4)

Les fibres rapides de type II sont préférentiellement atteintes ce qui engendre une prédominance des fibres lentes de type I souvent groupées (Kornegay et al., 1988). Par microscopie électronique, on retrouve au niveau des fibres une désorganisation des myofibrilles, une dilatation du réticulum endoplasmique, une augmentation du glycogène ainsi qu'une hyperplasie et hypertrophie des mitochondries (Kornegay et al., 1988; Valentine et al., 1990).

Les fibres musculaires des chiens GRMD n'expriment pas la dystrophine à l'exception de quelques fibres révertantes ne dépassant généralement pas plus de 1% des fibres (Schatzberg et al., 1998). On révèle cependant une augmentation de l'expression de l'utrophine ainsi qu'une présence d'un nombre anormalement élevé de fibres exprimant l'isoforme développementale de la myosine qui témoigne d'une activité de régénération persistante (Lanfossi et al., 1999).

Les lésions précédemment citées présentent des variations en terme d'intensité selon les muscles et les individus (Kornegay et al., 1988, 2003; Valentine et al., 1990).

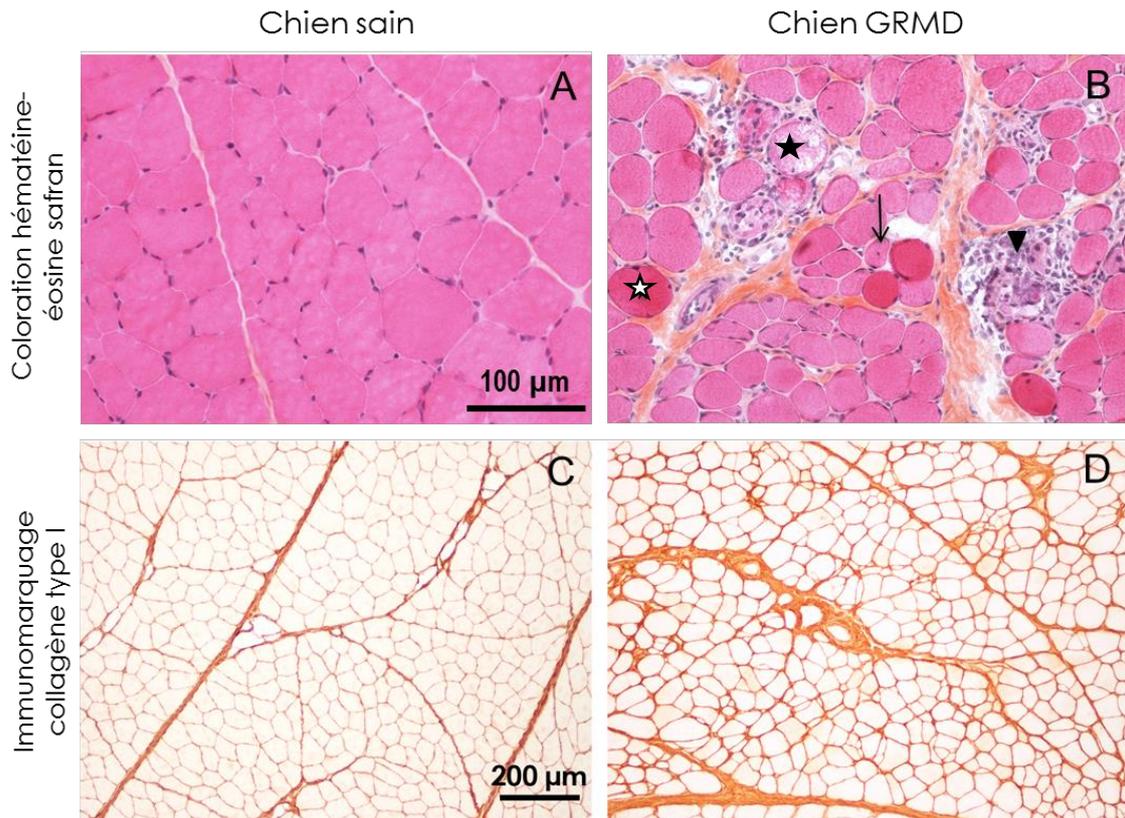


Figure 4 **Lésions histologiques caractéristiques du chien GRMD**

**Coloration hémateïne-éosine safran sur coupe de muscle de chien sain (A) et GRMD (B).** Par opposition au muscle de chien sain qui présente des fibres jointives et de calibre homogène, le muscle de chien GRMD se caractérise par un ensemble de lésions. Il présente des fibres hyalines hypertrophiques correspondant à des fibres pré-nécrotiques (étoile blanche), des foyers de nécrose (étoile noire) ainsi que des infiltrats inflammatoires (tête de flèche pleine). La présence de fibres à noyau centronucléé (flèche) qui témoigne d'une régénération musculaire est également notée au même titre qu'une anisocytose. **Immunomarquage du collagène de type I sur coupe de muscle de chien sain (C) et GRMD (D).** Un développement du tissu conjonctif est observé chez le chien GRMD aboutissant à un épaissement du tissu interstitiel autour des faisceaux musculaires (fibrose pérимыsiale) et au sein même des faisceaux musculaires (fibrose endomyosiale).

#### 1.4.2.2 Chien CXMDJ

Des Beagles ont été croisés avec des Golden Retrievers myopathes dans le but d'obtenir des chiens de plus petite taille afin de diminuer les coûts et de faciliter l'élevage et les traitements des chiens. Une de ces souches a été établie au Japon ; il s'agit du chien CXMD<sub>J</sub> (Canine X-Linked Muscular Dystrophy) (Shimatsu et al., 2003, 2005; Yugeta et al., 2006). Le niveau de CK dans le sérum de ces chiens est très élevé à la naissance et le taux de mortalité au cours de la période post-natale est de 32,3% (Nakamura and Takeda, 2011). Les symptômes évoluent rapidement jusqu'à l'âge de 10 mois, mais ensuite cette progression de la pathologie est retardée. Les manifestations cliniques de la troisième génération de CXMD<sub>J</sub> sont plus modérées que celles observées chez le chien GRMD.

### 1.4.3 Autres modèles

Il existe des modèles animaux non mammaliens de la DMD, tels que le poisson zèbre *Sapje* (Bassett et al., 2003), le ver *Caenorhabditis elegans* (Bessou et al., 1998; Gieseler et al., 2000) et la drosophile *Drosophila melanogaster* qui possèdent des homologues de la dystrophine (Van der Plas et al., 2007; Roberts, 1998; Shcherbata et al., 2007). Ces modèles, bien qu'ayant une pathogénie très différente de celle de l'Homme, présentent l'avantage de pouvoir être manipulés en grand nombre et d'être modifiables sur le plan génétique. Ils peuvent notamment permettre un criblage à haut débit de molécules potentiellement intéressantes en vue d'une thérapie pharmacologique.

Un modèle félin a également été identifié et nommé HFMD (Hypertrophy Feline Muscular Dystrophy) pour sa particularité hypertrophique (Carpenter et al., 1989; Gaschen et al., 1992). Ces chats dystrophiques ne sont pas largement utilisés comme modèle de la DMD compte tenu d'une faible similarité avec la pathologie humaine.

Un modèle de porc transgénique a été généré par une suppression ciblée de l'exon 52 de la dystrophine, une mutation fréquente chez les patients DMD, afin d'obtenir un autre modèle « gros animal » de la DMD. Ce modèle présente une absence de dystrophine dans les muscles squelettiques, une augmentation du taux de CK sérique, une faiblesse musculaire progressive et une espérance de vie de 3 mois due à des insuffisances respiratoires. Sa caractérisation a récemment été complétée par une étude transcriptomique réalisée à 2 jours et à 3 mois (Klymiuk et al., 2013).

## Chapitre 2. Les stratégies thérapeutiques de la DMD

Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement efficace de la DMD. Seuls des traitements palliatifs, qui visent à contrer les effets de la maladie, sont proposés aux patients. Cependant, trois stratégies thérapeutiques de la DMD sont à l'étude : les traitements pharmacologiques, la thérapie génique et la thérapie cellulaire (Figure 5). Ces stratégies vont chercher soit à ramener une expression de dystrophine, soit à agir sur les cascades physiopathologiques en aval et notamment sur l'homéostasie calcique, le stress oxydatif et l'activité des mitochondries.

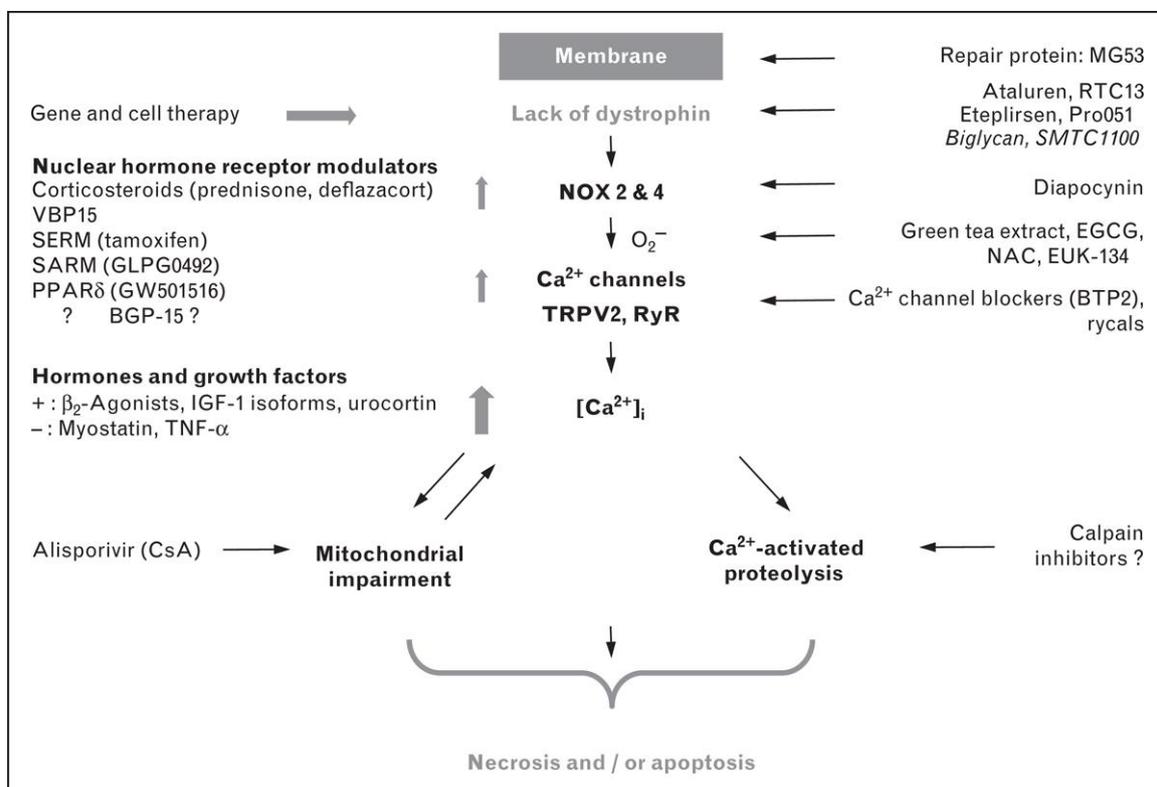


Figure 5 Stratégies thérapeutiques de la DMD

Les stratégies thérapeutiques peuvent cibler plusieurs niveaux des mécanismes pathologiques. Elles peuvent agir directement sur l'absence de la dystrophine, au niveau du stress oxydatif et des NADPH oxydases (NOX), au niveau des canaux calciques, des mitochondries et de la protéolyse. (Ruegg, 2013)

## **2.1 Traitements pharmacologiques**

### **2.1.1 Traitements anti-inflammatoires**

#### 2.1.1.1 Glucocorticoïdes stéroïdiens

Les glucocorticoïdes, tels que la prednisolone ou prednisone et le deflazacort, sont les seules molécules ayant montré un bénéfice à moyen et long terme pour les patients DMD (McAdam et al., 2012). Ces trois corticostéroïdes ont les mêmes rapports bénéfice/risque. Ils permettent un effet sur la force musculaire, un prolongement de la période ambulatoire, une préservation de la fonction respiratoire et une réduction de l'incidence des scoliose et cardiomyopathies dilatées chez les enfants DMD qui tolèrent un traitement à long terme (Biggar et al., 2001, 2004; Markham et al., 2008). Cependant, ils s'accompagnent d'effets secondaires tels que la prise de poids à court terme, la déminéralisation osseuse et les fractures vertébrales à long terme (Goemans and Buyse, 2014). Le traitement est ainsi souvent pris de manière discontinue du fait de ses effets secondaires (Escolar et al., 2011; Ricotti et al., 2013). Une étude récente montre que les stéroïdes DELTA 9(11) possèdent de nouvelles propriétés inflammatoires puisqu'ils conservent l'inhibition de NF- $\kappa$ B mais ne présentent plus les effets délétères des glucocorticoïdes. Le VBP15 semble prometteur puisqu'il inhibe le NF- $\kappa$ B, permet la translocation des récepteurs aux glucocorticoïdes au noyau comme la prednisone et dexaméthasone, perd les propriétés de transactivation et présente une bonne biodisponibilité (Reeves et al., 2013).

L'activation de NF- $\kappa$ B peut également être bloquée par des inhibiteurs du protéasome qui préservent le DAPC de la protéolyse. Le Bortezomib, qui inhibe l'activité chymotrypsine-like du protéasome 26S, permet après injection intraveineuse de diminuer l'inflammation et de maintenir partiellement l'expression des protéines associées à la dystrophine dans les muscles de chiens GRMD (Araujo et al., 2013). Cependant, ce traitement n'est pas suffisant pour contrer les signes de la maladie. Il pourrait en revanche être utilisé en combinaison avec d'autres traitements.

#### 2.1.1.2 Immunomodulateurs

Le mécanisme exact des glucocorticoïdes dans le traitement de la DMD n'étant pas connu, il a été supposé que leur effet positif pourrait être attribué à leur rôle immunomodulateur. Ainsi, des études portant sur d'autres immunosuppresseurs ont été réalisées. Cependant, un

essai réalisé sur 99 garçons DMD n'a pas permis de démontrer un effet positif de l'azathioprine seul ou en association avec de la prednisone (Griggs et al., 1993). De la même manière, une étude en double-aveugle effectuée sur 146 patients DMD ambulants ayant reçu de la cyclosporine A n'a pas permis de conclure à un effet de cette dernière sur la force musculaire des patients (Kirschner et al., 2010).

### 2.1.2 Surexpression d'utrophine

L'utrophine est une protéine homologue de la dystrophine et peut mimer plusieurs de ses fonctions. Cette protéine, exprimée principalement dans les muscles au cours du développement embryonnaire, est retrouvée surexprimée dans les fibres musculaires des patients DMD (Mizuno et al., 1993) et la quantité d'utrophine est inversement corrélée à la sévérité de l'atteinte locomotrice (Kleopa et al., 2006). Une surexpression d'utrophine fait donc partie des pistes de traitement dont l'avantage, en tant que protéine du soi, est son absence d'immunogénicité en situation physiologique. Une molécule permettant de surexprimer l'utrophine, le SMT C1100, a montré des résultats encourageants chez la souris *mdx* (Tinsley et al., 2011). Un essai clinique de phase I a évalué une formulation orale de la SMT C1100 à des doses croissantes chez 48 volontaires sains. Lorsque la dose de SMT C1100 est augmentée de 50 mg/kg à 400 mg/kg, son taux sanguin atteint celui qui est requis pour pouvoir obtenir l'augmentation de la production d'utrophine de 50 %, *in vitro*, dans des myoblastes de patients DMD en culture (résultats présentés au congrès de la «World Muscle Society» en 2012 et disponibles sur le site <http://www.summitplc.com>). Un essai de phase Ib sur des patients DMD est actuellement en cours. La biglycane, une protéoglycane de la MEC associée au DAPC, est connue pour surexprimer l'utrophine et la stabiliser à la membrane. Un recombinant de la biglycane humaine est à l'étude en vue d'une potentielle utilisation clinique (Young and Fallon, 2012).

### 2.1.3 Augmentation de la masse musculaire

De nombreux facteurs de croissance et hormones endogènes régulent les processus de régénération, la croissance ou bien l'atrophie et la nécrose, et il existe ainsi des traitements qui visent à stimuler la régénération et à augmenter la masse musculaire pour lutter contre l'atrophie musculaire des patients DMD. L'adrénaline, qui agit sur les récepteurs  $\beta_2$ , et l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor) ont des effets anabolisants. Le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor-alpha), stimulé par la voie NF- $\kappa$ B, est impliqué dans les processus de nécrose et

d'atrophie musculaire tandis que le TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor-beta) est impliqué dans la fibrose (Adams et al., 2008; Mann et al., 2011; Narola et al., 2013; Sishi and Engelbrecht, 2011). Ces dernières années, on a cherché à utiliser des agonistes  $\beta$ 2, des anticorps dirigés contre le TNF- $\alpha$  et TGF- $\beta$  ou bien des inhibiteurs de NF- $\kappa$ B. L'inhibition par des anticorps neutralisants de l'activine A, qui fait aussi partie de la famille des TGF- $\beta$ , permet dans un muscle de souris lésé à la cardiotoxine d'activer la dégradation tissulaire et d'augmenter la myogenèse ce qui permet d'accélérer la récupération de la force musculaire (Yaden et al., 2014). Le losartan, un antagoniste synthétique oral des récepteurs de l'angiotensine II et qui réduit significativement l'activité TGF- $\beta$ , a montré un effet positif sur le cœur de souris *mdx* mais pas sur le muscle squelettique (Bish et al., 2011).

La myostatine, qui appartient à la famille du TGF- $\beta$ , est impliquée dans la régulation de la taille des fibres et des souris KO (Knock-Out) pour la myostatine développent une hypertrophie musculaire et une hyperplasie (McPherron et al., 1997). Par ailleurs, les inhibiteurs de la myostatine, tels que des anticorps neutralisants (Bogdanovich et al., 2002), la follistatine (Nakatani et al., 2008) ou bien un propeptide myostatine (Böttinger et al., 1996) pourraient stimuler la régénération musculaire et diminuer l'atrophie des patients DMD. Un essai de phase I/II réalisé avec un anticorps neutralisant de la myostatine, le MYO-029, sur des patients atteints de dystrophie musculaire (BMD, dystrophie facio-scapulo-humérale ou dystrophie musculaire des ceintures) a montré la sécurité de l'approche mais n'a pas permis de démontrer une amélioration de la force musculaire (Wagner et al., 2008). Une nouvelle stratégie qui consiste à cibler simultanément la myostatine et la dystrophine par des approches de thérapie génique (évoquées au paragraphe 2.2) est désormais proposée (Dumonceaux et al., 2010; Kemaladewi et al., 2011; Malerba et al., 2012; Rodino-Klapac et al., 2013). Il apparaît nécessaire de combiner la restauration de dystrophine et l'inhibition de la myostatine afin de permettre une plus grande résistance aux contractions (soit une diminution des lésions associées) ainsi qu'une amélioration de la force (Dumonceaux et al., 2010; Rodino-Klapac et al., 2013).

#### 2.1.4 Translecture du codon stop

La gentamycine, un antibiotique de la famille des aminoglycosides, a initié cette stratégie de lecture forcée au travers des codons stops qui consiste en l'utilisation de molécules qui se fixent aux ribosomes et permettent l'insertion d'un acide aminé au niveau d'un codon stop prématuré (Malik et al., 2010). Il en résulte une production de la dystrophine entière. Une

autre molécule le PTC124 (Premature Termination Codon 124), identifiée par PTC Therapeutics et aussi connu sous le nom d'ataluren, est une molécule administrée par voie orale en cours d'étude clinique de phase III (<http://www.clinicaltrials.gov: NCT01826487>) (Finkel et al., 2013). Cette molécule se lie sur la sous-unité 60 de l'ARN ribosomal et a montré une efficacité similaire à la gentamycine chez la souris *mdx* avec une expression de dystrophine dans 20-25% des fibres musculaires (Pichavant et al., 2011). Plus récemment, le RTC13 (Read-Through Compound 13) qui montre une translecture plus efficace du codon stop UAA a permis l'expression de dystrophine chez la souris *mdx* dans tous les principaux groupes de muscles incluant le diaphragme et le cœur ainsi qu'une augmentation de la force musculaire et une diminution du taux de CK (Kayali et al., 2012).

## **2.2 Thérapie génique**

En thérapie génique, les transgènes contiennent généralement les séquences complémentaires de l'ADN (ADNc) qui comprennent seulement les régions codantes. Le principal challenge de la thérapie génique de la DMD est la taille très importante de l'ADNc de la dystrophine (13 kb) et plusieurs stratégies ont été développées pour apporter un gène codant une forme raccourcie mais fonctionnelle de la dystrophine : la micro- et la mini-dystrophine qui peuvent être véhiculées par des vecteurs viraux tels que les rétrovirus et lentivirus.

### **2.2.1 Expression de mini- et micro-dystrophine**

#### **2.2.1.1 Lentivirus**

Les lentivirus sont capables d'encapsider la mini-dystrophine et un vecteur lentiviral portant ce gène partiel de la dystrophine a été injecté en intramusculaire à des souris *mdx* adultes et nouvellement nées (Kobinger et al., 2003). Les meilleurs résultats sont obtenus pour les souris les plus jeunes avec 65 % des fibres exprimant le transgène. De plus, les muscles sont plus résistants à la contraction et sont capables de générer une force plus importante. A ce jour, il n'y a pas d'études réalisées sur des modèles «gros animaux».

#### **2.2.1.2 Virus associés aux adénovirus (AAV)**

Il existe différents sérotypes d'AAVs, caractérisés par des tropismes tissulaires variés, et les plus fréquemment utilisés pour la thérapie génique du muscle sont les sérotypes 1, 2, 6, 8 et 9. Les vecteurs AAVs se sont montrés efficaces pour une injection locale ou systémique

dans le muscle squelettique et le cœur de souris (Gregorevic et al., 2004) mais la capacité d'encapsulation des AAVs est limitée à 4,7 kb. Les AAVs transportent donc des transgènes codant la micro-dystrophine. Une récente étude a présenté les résultats d'une administration intramusculaire d'un AAV9, transportant un transgène de la micro-dystrophine, chez des chiens dystrophiques. Une nette expression de la micro-dystrophine est observée après 2 mois malgré une infiltration de cellules T. Une restauration du DAPC et une réduction des lésions tissulaires (inflammation, fibrose, calcification) sont également rapportées dans les muscles des chiens traités (Shin et al., 2013). Ces résultats apportent la preuve de concept de l'efficacité d'une thérapie génique avec le gène de micro-dystrophine dans un modèle de grande taille.

Cependant, cette dystrophine plus courte ne possède pas tous les domaines requis pour interagir avec les membres du complexe DAPC tels que la nNOS, les syntrophines et la dystrobrevine. Ces domaines sont importants pour augmenter la fonctionnalité de la dystrophine et stabiliser la membrane. Une nouvelle méthode permettant de transférer le gène entier de la dystrophine a récemment été développée et consiste à introduire simultanément trois AAVs indépendants transportant chacun une partie codante du gène humain de la DMD. Les résultats ont montré une restauration d'expression de la dystrophine dans les fibres musculaires de souris *mdx* (Koo et al., 2014).

### 2.2.2 Saut d'exon

La plupart des mutations du gène de la dystrophine correspondent à des délétions qui provoquent des ruptures du cadre de lecture. La longueur et les caractéristiques structurales de la dystrophine, qui contient des domaines répétés, permet d'envisager la suppression d'exons durant l'épissage afin d'obtenir une protéine tronquée mais dont la fonction reste partiellement préservée. Les premiers essais de « saut d'exon » ou « exon skipping » se sont concentrés sur l'exon 51 puisqu'une délétion dans cet exon préservant le cadre de lecture aboutit à un phénotype similaire à celui des patients BMD et qu'une rupture du cadre de lecture correspond à au moins 20% des mutations DMD.

L'épissage peut être modulé par des oligonucléotides antisens (AONs), qui sont des molécules d'ADN capables de se fixer à des sites introniques et exoniques d'ARNm. Chez les patients DMD, les AONs sont utilisés pour exclure certains exons du transcrit de la dystrophine et restaurer le cadre de lecture. Les AONs utilisés dans les études cliniques sont

majoritairement des « 2'-O-methyl-phosphorothioates » (2OMePS) ou des « phosphorodiamate morpholino oligomers » (PMO).

La société pharmaceutique Prosensa propose le drisapersen (GSK2402968, PRO051) comme molécule permettant le saut d'exon 51 dans la DMD (Flanigan et al., 2014). Elle a annoncé dans un communiqué de presse du 17 mars 2014 et à la MDA Clinical Conference 2014 (16-19 mars, à Chicago) de nouveaux résultats préliminaires encourageants de l'essai de phase II (NCT01462292) qui s'est déroulé aux États-Unis. Ces résultats indiquent une stabilisation et même une amélioration de la fonction motrice et de l'activité physique des garçons traités par la plus forte dose (6 mg/kg/semaine) comparées à celles des garçons sous placebo, non seulement au bout des 24 semaines de traitement mais aussi après 48 semaines. Ces résultats encourageants ont fait suite à un premier essai de phase III (NCT01254019) qui avait été suspendu suite à des résultats décevants. Un nouvel essai clinique de phase III (NCT01803412) est actuellement en cours aux États-Unis pour évaluer la sécurité, la tolérance et l'efficacité de l'administration à long terme de drisapersen chez des patients DMD. Les premiers résultats semblent montrer un effet significatif du drisapersen sur la marche après 96 semaines de traitement (poster présenté au 66<sup>ème</sup> congrès de l' « American Academy of Neurology »). Un autre essai clinique visant le saut d'exon 44 est également en cours en phase I/II (PRO054).

Concernant les PMOs, l'eteplirsén (AVI-4658) fait l'objet d'un essai de phase clinique II qui vise à tester son administration systémique et l'efficacité de doses croissantes. D'après les premiers résultats, l'administration systémique s'est montrée sûre et l'expression de dystrophine est proportionnelle à la dose administrée (Cirak et al., 2011). Une extension d'étude pour un suivi à 48 semaines est en cours et une phase III est envisagée.

Une des limites importantes dans la stratégie de ces essais cliniques est qu'il existe de nombreuses délétions du gène *DMD* et qu'elles requièrent des séquences AONs spécifiques. Chaque séquence devrait être considérée comme un agent thérapeutique qui nécessite une étude préclinique complète et qui doit passer les différentes phases des essais cliniques. Pour les délétions très rares, il est plus difficile d'obtenir une population représentative pour des essais. Des stratégies de multiple sauts d'exon sont désormais développées pour évaluer la possibilité de traiter des patients portant des délétions différentes avec le même composé (Aoki et al., 2013). De récentes études qui utilisent différents AONs ciblant plus de dix exons

ont démontré la faisabilité de la stratégie dans des modèles cellulaires et animaux (Adkin et al., 2012; Aoki et al., 2012; Yokota et al., 2012).

Le saut d'exon est également utilisé en combinaison avec les vecteurs AAV. Notamment, des U7snRNA portant des séquences antisens pour le saut des exons 6 à 9 de la dystrophine ont été injectés en locorégional dans des muscles de chiens GRMD par transfert de gène avec un AAV1 (Vulin et al., 2012). Les résultats montrent une correction du phénotype dystrophique dans une zone musculaire étendue et une récupération partielle de la force musculaire. Cependant, le suivi à 5 ans a montré une diminution progressive du nombre de fibres corrigées dès 6 mois.

Lors du développement d'approches thérapeutiques utilisant les vecteurs AAV, plusieurs difficultés sont rencontrées (Govoni et al., 2013) :

- Définir une construction de vecteur appropriée,
- Produire une quantité suffisante des particules virales infectieuses à faible coût et répondant aux contraintes GMP (Good Medical Practice),
- Obtenir une diffusion importante des vecteurs depuis le site d'injection,
- Pouvoir réaliser des injections multiples. Une réponse immunitaire peut se traduire par une production d'anticorps neutralisants qui empêche des transductions successives avec le même sérotype d'AAV. Une réponse immune à médiation cellulaire liée à la persistance des particules virales peut également être engendrée.

## **2.3 Thérapie cellulaire**

La thérapie cellulaire désigne la greffe de cellules visant à restaurer les fonctions d'un tissu ou d'un organe lorsqu'elles sont altérées par un accident, une pathologie ou le vieillissement. Cette approche thérapeutique a bénéficié des avancées scientifiques récentes sur les cellules souches.

### **2.3.1 Définition d'une cellule souche**

Les cellules souches permettent le développement, le renouvellement et la réparation des tissus et organes. On définit une cellule souche comme étant une cellule indifférenciée ayant la capacité de se diviser à l'identique de manière indéfinie et de produire des cellules différenciées. Elle est donc capable à la fois d'auto-renouvellement et de différenciation. Ceci est possible grâce à la capacité qu'ont les cellules souches à réaliser des divisions

asymétriques (Macara and Mili, 2008; Neumüller and Knoblich, 2009). Lors d'une division asymétrique, une cellule souche donne lieu à une cellule fille identique à la cellule souche qui restera quiescente et une autre cellule fille initiant un programme de différenciation. Ce type de division est essentiel au maintien du pool de cellules souches.

### 2.3.1.1 Classification des cellules souches

Les cellules souches se situent dans les tissus embryonnaires mais aussi dans les tissus adultes et sont caractérisées par des stades de maturation variables, liés au développement, qui déterminent leur potentiel de différenciation. Ces stades de maturation sont fortement liés au développement. La différenciation est un engagement de la cellule vers une lignée suite à l'influence de facteurs intrinsèques (programme d'expression génique) et/ou extrinsèques (micro-environnement ou niche) qui perd alors sa capacité d'auto-renouvellement. On peut classer les cellules souches en fonction de leur capacité de différenciation en cellules totipotentes, pluripotentes, multipotentes et unipotentes (Figure 6).

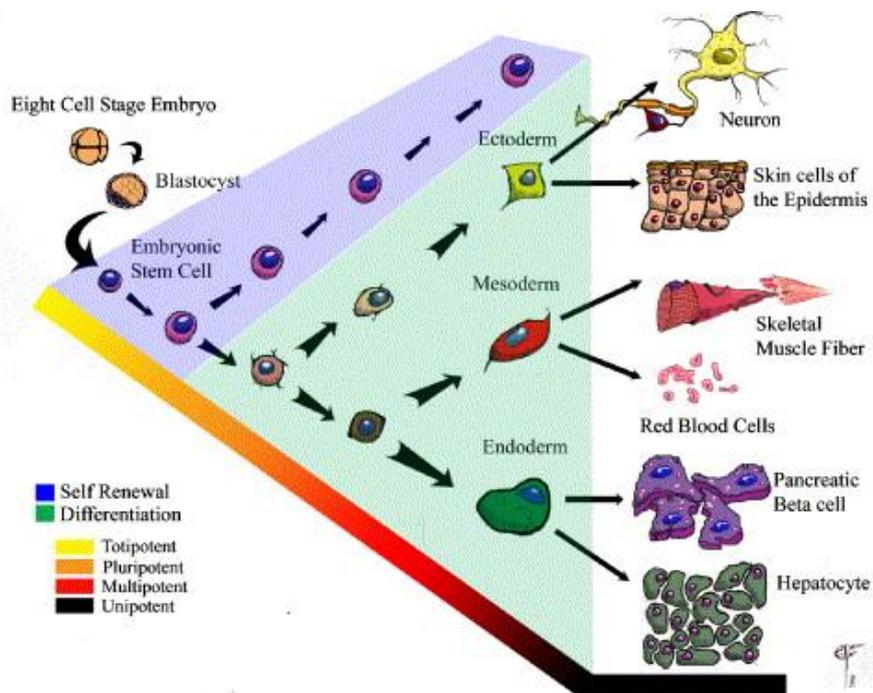


Figure 6 **Hiérarchie des cellules souches**

Progression des cellules souches au cours du développement : de l'état de totipotence à la différenciation terminale en passant par les états intermédiaires. (Price et al, 2007)

### **- Cellules totipotentes**

Les cellules totipotentes sont des cellules pouvant donner toutes les lignées cellulaires y compris les annexes embryonnaires. Elles sont potentiellement capables de donner naissance à un individu entier. Chez les mammifères, elles correspondent aux cellules issues des premières divisions de l'œuf fécondé, allant du zygote au blastomère 8 cellules (4<sup>ème</sup> jour).

### **- Cellules pluripotentes**

Les cellules pluripotentes sont des cellules pouvant donner toutes les lignées cellulaires constituant un individu, mais pas les annexes embryonnaires. Elles sont capables de se différencier en plus de 200 types cellulaires mais sont incapables d'engendrer un organisme dans sa totalité. Elles comprennent les cellules souches embryonnaires (ES) (embryon de 5 à 7 jours) ainsi que les cellules souches de la lignée germinale (de 5 à 10 jours).

### **- Cellules multipotentes**

Les cellules multipotentes peuvent donner les différents types de cellules spécialisées d'un lignage cellulaire donné. Elles sont déjà engagées dans un programme tissulaire spécifique. Elles sont présentes dans le sang du cordon ombilical et dans tout l'organisme mais y sont peu nombreuses. Les cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse qui sont à l'origine de toutes les cellules du sang en sont un exemple.

### **- Cellules unipotentes**

Les cellules souches unipotentes sont capables de se différencier en une lignée cellulaire seulement. Ce processus est essentiel dans l'auto-renouvellement des tissus.

De façon caractéristique, une cellule souche qui se différencie génère un (ou plusieurs) types cellulaires intermédiaires. Ces cellules intermédiaires sont appelées les progéniteurs. Dans les tissus fœtaux ou adultes, les progéniteurs peuvent se diviser et donner naissance soit à d'autres progéniteurs, soit aux cellules différenciées. Ils sont déjà engagés dans une voie de développement spécifique, et peuvent remplacer les cellules endommagées ou mortes, maintenant ainsi l'intégrité et les fonctions d'un tissu. Les cellules souches épidermales sont, par exemple, localisées dans la région du bourgeon du follicule pileux et servent à régénérer le follicule pileux et l'épiderme. Les cellules souches intestinales sont localisées à la base des cryptes du colon.

Les cellules unipotentes se distinguent des précurseurs qui sont des cellules engagées dans un processus de différenciation sans possibilité de retour en arrière et qui n'ont pas de propriétés de renouvellement.

### 2.3.2 Critères d'un candidat à la thérapie cellulaire de la DMD

Les cellules souches idéales pour le traitement de la DMD doivent théoriquement remplir les critères suivants (revue Meng et al., 2011) :

- Pouvoir être amplifiées *in vitro* sans perdre leurs propriétés de cellule souche,
- Avoir un statut immunologique privilégié,
- Etre administrables par voie systémique, puisque la majorité des muscles du corps sont affectés,
- Pouvoir survivre, proliférer et migrer pour diffuser le plus possible jusqu'aux tissus cibles,
- Etre capables de se différencier en fibres musculaires pour réparer les fibres endommagées ou remplacer les fibres perdues,
- Reconstituer un ensemble de cellules satellites, de telle sorte qu'elles soient présentes pour réparer et maintenir une fibre avant qu'elle n'entre en nécrose,
- Etre capables d'exprimer la dystrophine une fois qu'elles ont participé à la formation de fibres musculaires,
- Doivent aboutir à une amélioration de la force musculaire afin de permettre une meilleure qualité de vie aux patients DMD.

### 2.3.3 Deux grandes familles de cellules souches au potentiel myogénique

#### 2.3.3.1 Cellules pluripotentes

##### A. Cellules souches embryonnaires (ES)

Les ES sont des cellules pluripotentes isolées à partir de la masse interne du stade blastocyste de l'embryon. Elles peuvent être maintenues à un état indifférencié en présence de conditions de culture spécifiques.

Les premières études de transplantation réalisées à partir de cellules ES murines ou humaines en différenciation n'ont pas montré un potentiel myogénique important de ces cellules. En effet, des cellules ES murines, co-cultivées 4 jours avec des fibres musculaires dissociées avant transplantation chez la souris *mdx*, ne permettent de détecter la dystrophine

que dans quelques régions sélectionnées (Bhagavati and Xu, 2005). Dans une seconde étude, des cellules humaines ES ont été différenciées en cellules souches mésenchymateuses (CSM) avant transplantation chez la souris immunodéficiente. Ce protocole ne permet d'obtenir que très peu de cellules myogéniques (Barberi et al., 2007).

Plus récemment, des approches d'expression transitoire de Pax3 ou Pax7 ont permis de générer *in vitro* de nombreux progéniteurs myogéniques dérivés des cellules ES. Leur transplantation chez la souris dystrophique permet de générer des myofibres, de reconstituer un pool de cellules en position satellitaire et d'améliorer la force musculaire (Darabi et al., 2009, 2011). L'utilisation clinique des cellules embryonnaires présente cependant des limites du fait du rejet potentiel de ces cellules mais également des considérations éthiques.

## B. Cellules pluripotentes induites (iPS)

Différents groupes travaillent sur la reprogrammation des cellules souches somatiques avec l'idée de les ramener à un état indifférencié et pluripotent proche de celui des cellules ES. L'un des intérêts recherchés est de pouvoir générer des cellules pluripotentes à partir de cellules adultes du patient même pour des stratégies de thérapie autologue. En 2006, l'équipe de Yamanaka a pour la première fois décrit un protocole qui permet de générer des cellules pluripotentes induites (iPS) à partir de fibroblastes adultes de souris et ce consécutivement à l'introduction de quatre facteurs de pluripotence : Oct3/4, Sox2, c-Myc, and Klf4 (Takahashi and Yamanaka, 2006). Ils ont démontré également en 2007 la possibilité de produire des cellules iPS humaines à partir de ces mêmes facteurs (Takahashi et al., 2007). Les cellules iPS humaines présentent des caractéristiques identiques aux cellules ES en terme de morphologie, prolifération ou encore de marqueurs de surface. De plus, elles peuvent se différencier en types cellulaires des trois feuilletts embryonnaires et générer des tératomes en injection sous-cutanée chez la souris *nude*. Sur la base de ces découvertes, de nombreux autres groupes étudient le potentiel des cellules iPS et leurs capacités de régénération.

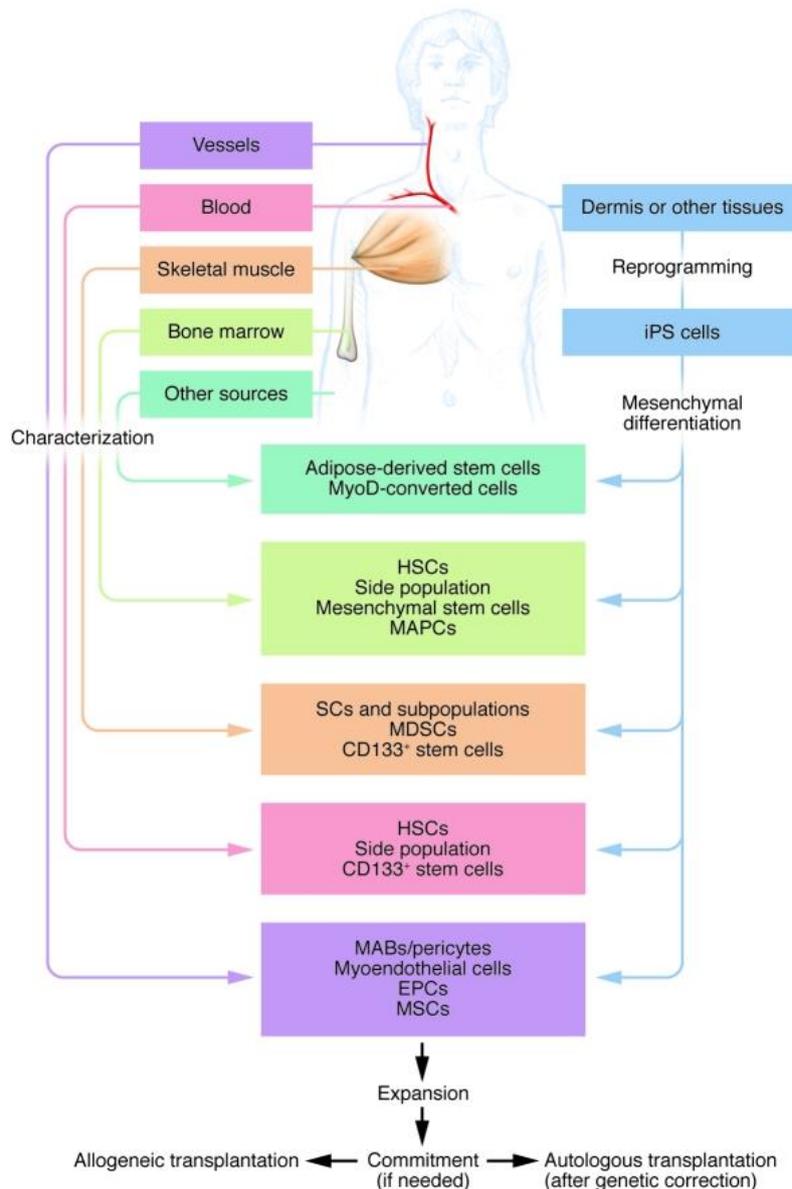
Plusieurs protocoles permettant d'obtenir des progéniteurs myogéniques à partir de cellules iPS ont récemment été publiés (Darabi et al., 2012; Goudenege et al., 2012; Tedesco et al., 2012). Ils consistent en un engagement mésodermique des cellules iPS suivi d'une surexpression transitoire de facteurs de transcription myogéniques. Darabi et Goudenege montrent une reprogrammation particulièrement efficace respectivement par une surexpression de MyoD avec un adénovirus ou de Pax7 avec un lentivirus.

L'utilisation de cellules ES ou bien iPS à des fins thérapeutiques est cependant limitée par les difficultés rencontrées pour la différenciation en cellules d'un lignage spécifique. De plus, la purification cellulaire s'avère nécessaire afin d'éviter tout risque oncogène.

#### 2.3.3.2 Cellules souches adultes

##### A. Présentation des populations cellulaires candidates

Plusieurs populations cellulaires, ayant montré leur potentiel myogénique en conditions expérimentales soit *in vitro* soit sur des modèles rongeurs, sont présentées comme de potentielles candidates à la thérapie de la DMD (Figure 7). Celles-ci se distinguent en fonction de leur origine, de leur méthode d'extraction et d'amplification, de leurs marqueurs, de leur potentiel de différenciation *in vitro* et de leur efficacité *in vivo*. Certaines font l'objet d'essais cliniques en cours. Ces populations cellulaires sont décrites successivement dans cette partie.



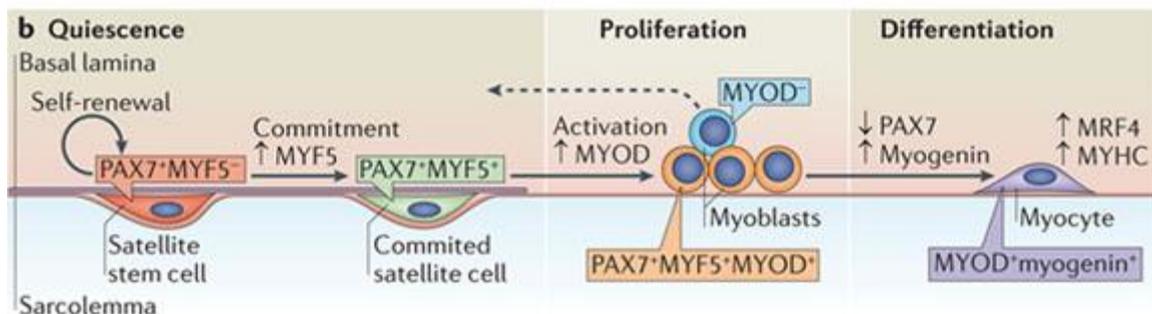
**Figure 7 Classement des différentes cellules souches au potentiel myogénique selon leur origine**

Les cellules souches qui permettent une régénération du muscle squelettique sont classées selon leur origine (vaisseaux, circulation sanguine, muscle squelettique, moelle osseuse et autres). Les cellules reprogrammées (induced Pluripotent Stem cells : iPS) ont également un potentiel myogénique. Une fois extraites ces populations cellulaires peuvent être caractérisées, amplifiées, puis transplantées. (Tedesco et al., 2010)

## B. Précurseurs myogéniques : Les cellules satellites et leurs descendants les myoblastes

### Définition

Décrites pour la première fois par Mauro en 1961, les cellules satellites sont appelées ainsi du fait de leur localisation périphérique, entre le sarcolemme de la myofibrille et la lame basale. Elles restent quiescentes jusqu'à ce qu'elles soient sollicitées pour la croissance ou la réparation du muscle. Lorsqu'elles reçoivent des signaux d'activation, elles prolifèrent rapidement et produisent ainsi un ensemble de myoblastes qui fusionnent entre eux pour former de nouvelles myofibrilles ou bien avec les fibres lésées pour les réparer (Montarras et al., 2005). Consécutivement à leur activation, elles co-expriment les facteurs Pax7 et MyoD. Ensuite, elles prolifèrent, répriment l'expression de Pax7 tout en maintenant celle de MyoD et se mettent à exprimer la myogénine pour se différencier (Figure 8). Certains cellules satellites en revanche ne se différencient pas et peuvent retourner à l'état quiescent pour maintenir l'ensemble de cellules souches (Zammit et al., 2004). Plusieurs milliers de myonucléi peuvent être générés à partir d'un petit nombre de cellules satellites transplantées issues d'une seule fibre (Collins et al., 2005) ou bien même d'une seule cellule satellite (Sacco et al., 2008), d'où leur efficacité reconnue pour réparer le muscle.



**Figure 8 Programme de détermination et de différenciation des cellules satellites régi par l'expression de facteurs de transcription et régulation myogénique (MRF)**

En quiescence, les cellules satellites constituent une population hétérogène de cellules résidant entre la lame basale et le sarcolemme : environ 90% sont des cellules satellites engagées dans le programme myogénique ( $Pax7^+Myf5^+$ ) tandis que les 10% restants se maintiennent à l'état de cellule souche satellite ( $Pax7^+Myf5^-$ ). Suite à l'activation, les cellules satellites engagées surexpriment les protéines de détermination des myoblastes (MyoD ; cellules  $Pax7^+Myf5^+MyoD^+$ ), rentrent dans le cycle cellulaire pour proliférer en tant que myoblastes et progressent dans la voie de différenciation en diminuant l'expression de Pax7 et en surexprimant la myogénine quand ils deviennent des myocytes. Durant la prolifération, l'hétérogénéité des cellules concernant l'expression de MyoD suggère que des myoblastes  $MyoD^-$  sont capables de retourner en quiescence (flèche en pointillés). (Wang and Rudnicki, 2012)

## Marqueurs des cellules satellites

Dans le muscle squelettique adulte, presque toutes les cellules satellites expriment le facteur de transcription Pax7, le facteur de régulation myogénique Myf5 ainsi que des protéines d'adhésion cellulaire (M-cadherine, Ncam et Vcam), cMet, CD34, les syndécanes 3 et 4, le récepteur aux chémokines CXCR4, la cavéoline-1 ou encore le récepteur à la calcitonine (Figure 9).

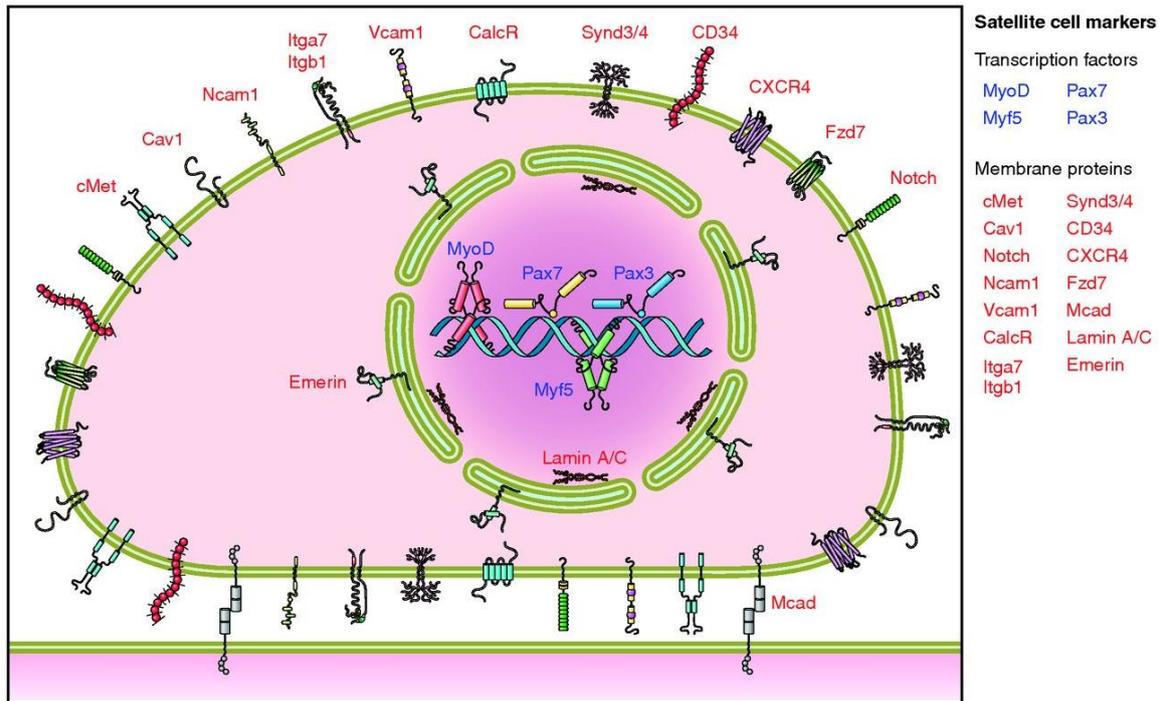


Figure 9 **Profil d'expression des cellules satellites**

De nombreuses protéines sont exprimées par les cellules satellites et peuvent être utilisées comme marqueurs pour les distinguer des autres populations cellulaires du muscle squelettique. Du fait de l'hétérogénéité de la population des cellules satellites, il est peu probable que ces marqueurs soient tous exprimés par une cellule satellite à un temps donné. Néanmoins, cet ensemble résume la localisation cellulaire des marqueurs utilisés pour identifier les cellules satellites qui comprennent des facteurs de transcription et des protéines membranaires. (Yin et al., 2013)

## Transplantation de myoblastes et ses limites

Les myoblastes ont longtemps été perçus comme des cellules idéales pour la thérapie cellulaire de la DMD. Partridge *et al.* ont montré dès 1978 que des myoblastes « donneurs » peuvent fusionner avec des myoblastes « receveurs » (Partridge et al., 1978). Il ont montré également qu'une injection de myoblastes hétérologues permet une expression de dystrophine chez la souris *mdx* (Partridge et al., 1989). Fort de ces résultats, plusieurs essais cliniques de transplantation de myoblastes ont eu lieu dans les années 1990. Cependant, ils se

sont montrés inefficaces dans les essais puisque l'injection de myoblastes chez les patients DMD n'a rapporté que très peu voir pas d'expression de dystrophine dans les muscles injectés et n'a pas engendré d'amélioration fonctionnelle (Gussoni et al., 1992; Huard et al., 1992; Karpati et al., 1993; Miller et al., 1997; Morandi et al., 1995; Tremblay et al., 1993a, 1993b). L'échec de ces essais a par la suite été attribué à plusieurs limitations (Briggs and Morgan, 2013; Péault et al., 2007) :

- Les myoblastes ont un faible taux de survie après la transplantation. Il est rapporté qu'au moins 75% des myoblastes transplantés meurent dans les trois jours après transplantation (Fan et al., 1996).
- Les myoblastes ont une faible capacité migratoire à partir de leur site d'injection. Les myoblastes ne migrent pas à plus de 200  $\mu\text{m}$  de la trajectoire d'injection intramusculaire (Péault et al., 2007).
- Les myoblastes transplantés génèrent une réponse immunitaire qui aboutit à leur rejet (Péault et al., 2007).

Les cellules satellites dans les conditions standards de culture sont activées et constituent des myoblastes primaires qui sont distincts des cellules satellites fraîchement isolées de muscle au niveau moléculaire et fonctionnel (Fukada et al., 2007; Montarras et al., 2005). Leur capacité d'auto-renouvellement ainsi que leur capacité régénérative en sont ainsi réduites. De plus, le profil d'expression génique des myoblastes primaires en culture diffère de celui des cellules satellites activées *in vivo* (Pallafacchina et al., 2010). Ces différences observées sont possiblement liées aux conditions de culture *in vitro* qui restent éloignées des conditions rencontrées par la cellule satellite dans sa niche *in vivo*.

Des cellules satellites fraîchement isolées (Pax7<sup>+</sup>) se montrent efficaces *in vivo*. En effet, après injection chez la souris, des cellules allogéniques sont capables de fusionner avec le muscle de l'hôte, de repeupler la niche satellitaire, d'améliorer la fonction musculaire et de maintenir leur capacité régénérative à long terme (Montarras et al., 2005; Rossi et al., 2011; Sacco et al., 2008). Des matrices peuvent être développées telles que des hydrogels d'acide hyaluronique afin de contrôler la distribution initiale des cellules implantées dans le site lésé et augmenter la concentration cellulaire et la rétention ou bien favoriser la myogenèse (Rossi et al., 2011). Les matrices doivent également être capables de se dégrader progressivement pour permettre la régénération des myofibres. Cependant, le nombre de cellules satellites fraîchement isolées qu'il serait nécessaire d'obtenir en thérapie humaine semble difficile à

obtenir étant donné la faible taille des biopsies musculaires standards ou pièces opératoires ainsi que leur disponibilité.

Il semble essentiel d'appréhender la niche satellitaire afin de pouvoir contrôler et manipuler les cellules satellites en conditions de culture. Le développement de techniques de bio-ingénierie pourrait permettre de présenter *in vitro* des conditions semblables à la niche satellitaire afin de pouvoir amplifier les cellules satellites tout en préservant leurs propriétés « souches » (Gilbert et al., 2010).

## C. Cellules souches extraites du muscle

### *Cellules souches associées aux vaisseaux*

#### ➤ Mesoangioblastes/Péricytes

A l'origine, les mésoangioblastes ont été isolés à partir de fragments d'aorte dorsale d'embryons de souris de 9,5 jours, au stade 22-24 somites, par digestion mécanique ou explantation (De Angelis et al., 1999; Cossu et al., 1996). Chez l'Homme et chez le chien, les mésoangioblastes sont obtenus à partir de « lambeaux de biopsies musculaires contenant des vaisseaux sanguins ». Les différentes étapes sont l'explantation, la dissociation des cellules et la mise en culture clonale (Morosetti et al., 2007; Sampaolesi et al., 2006).

Les mésoangioblastes murins ont une forte capacité proliférative *in vitro* et ces cellules, même après de nombreux passages en culture, peuvent se différencier en plusieurs lignages mésodermiques : os, cartilage, muscle lisse, cardiaque et squelettique (Minasi et al., 2002).

Les mésoangioblastes possèdent la capacité de migrer à travers les vaisseaux sanguins. Cette propriété est essentielle puisqu'elle permet à ces cellules souches, après injection par voie artérielle, de migrer jusqu'aux sites lésionnels afin de participer à la régénération des tissus (Sampaolesi et al., 2006). Il a d'ailleurs été montré que les mésoangioblastes, exposés *in vitro* au SDF-1 (Stromal-Derived Factor-1) ou TNF- $\alpha$ , augmentent considérablement leur potentiel de transmigration *in vitro* et de migration dans le muscle dystrophique *in vivo* (Galvez et al., 2006).

Le potentiel des mésoangioblastes a tout d'abord été testé en injection systémique dans un modèle de souris  $\alpha$ -sarcoglycane<sup>-/-</sup> ( $\alpha$ -SG). Il en résulte une restauration de l'expression de l' $\alpha$ -SG dans plus de 50% des myofibres mais également une amélioration fonctionnelle (Sampaolesi et al., 2003). Les mésoangioblastes ont ensuite été injectés par voie intra-

artérielle chez le chien GRMD ce qui a permis de restaurer la dystrophine dans des myofibres mais aussi d'améliorer la force musculaire des chiens (Sampaolesi et al., 2006).

Les mésoangioblastes font l'objet d'un essai clinique de phase I/II débuté en 2011, dont le premier objectif est de s'assurer de la sécurité de l'injection de ces cellules (DMD03). Des patients DMD, sous immunosuppression, reçoivent quatre injections intra-artérielles de mésoangioblastes de donneurs sains présentant une compatibilité HLA (human leukocyte antigen).

Les péricytes, ou cellules périvasculaires, sont des cellules situées au niveau de la lame basale de l'endothélium des capillaires. Les péricytes sont des cellules multipotentes qui ont montré leur capacité à se différencier en adipocytes, chondrocytes et ostéoblastes *in vitro*. Les péricytes qui n'expriment pas les marqueurs myogéniques Pax7, Myf5, MyoD peuvent néanmoins se différencier en muscle squelettique *in vitro* et *in vivo* (Dellavalle et al., 2007, 2011), suggérant que la myogenèse médiée par les péricytes suivrait un programme de différenciation myogénique différent de celui des cellules satellites. Les péricytes expriment les marqueurs CD146, le protéoglycan NG2 et PDGFR- $\beta$ 1 mais sont négatives pour les marqueurs CD45, CD34, CD31 et CD144, CD56 ce qui les différencie des cellules endothéliales, des cellules hématopoïétiques et des cellules satellites. Des péricytes isolées à partir d'autres tissus que le muscle squelettique tels que le pancréas, le tissu adipeux et le placenta ont une capacité myogénique en culture (Crisan et al., 2008). Les péricytes expriment les marqueurs caractéristiques des CSM : CD10, CD13, CD44, CD73, CD90 ce qui suggère que les péricytes pourraient représenter une portion significative des CSM chez l'adulte (Crisan et al., 2008; Schwab and Gargett, 2007) ou bien même que les CSM pourraient avoir une filiation périvasculaire (Crisan et al., 2011).

Le potentiel myogénique des péricytes a été montré *in vivo*. En effet, une injection par voie intra-artérielle de péricytes humains dans un modèle de souris immunodéficientes SCID/*mdx* (severe combined immunodeficiency-*mdx*) génère la formation de nombreuses fibres exprimant la dystrophine humaine et améliore la fonction des muscles traités (Dellavalle et al., 2007).

#### ➤ Cellules myo-endothéliales

Il a été décrit que certaines cellules co-expriment des marqueurs myogéniques et endothéliaux. Ces cellules représentent moins de 0,5% de la population cellulaire totale du muscle squelettique. Elles ont été caractérisées par cytométrie et sont

CD56<sup>+</sup> /CD34<sup>+</sup>/CD144<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>. Ces cellules, transplantées dans un modèle de souris SCID, sont capables de régénérer les fibres musculaires de muscles lésés par injection de cardiotoxine (Zheng et al., 2007). Elles montrent même une efficacité supérieure aux cellules myogéniques CD56<sup>+</sup> /CD34<sup>-</sup>/CD144<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>.

#### *Cellules de la Side Population (SP)*

Les cellules de la population marginale mSP (muscular side population) sont isolées par FACS (Fluorescence-activated cell sorting) à partir de muscle, sur la base d'une propriété d'exclusion du colorant vital Hoechst 33342 par le transporteur ABCG2, et se distinguent ainsi des cellules de la population MP (main population) (Doyle et al., 2011; Gussoni et al., 1999; Jackson et al., 1999; Montanaro et al., 2004). Elles résident dans l'interstitium du muscle squelettique et juxtaposent les vaisseaux sanguins. La majorité des cellules mSP expriment le marqueur Sca-1 (stem cell antigen-1) et sont négatives pour les marqueurs hématopoïétiques c-kit, CD45, CD43, les facteurs de régulation myogénique (MRFs) Pax7, Myf5 et le filament intermédiaire Desmine (Asakura et al., 2002; Gussoni et al., 1999; Montanaro et al., 2004; Schienda et al., 2006). Il existe cependant une hétérogénéité dans le phénotype des populations mSP selon les études (Kallestad and McLoon, 2010). Injectées en intraveineuse chez la souris *mdx* irradiée, ces cellules sont capables de reconstituer le compartiment hématopoïétique, fusionner avec les myotubes et restaurer partiellement l'expression de dystrophine (Gussoni et al., 1999). Douze semaines après l'injection, la dystrophine est détectée dans environ 4% des fibres. La transplantation intra-artérielle chez la souris *mdx*<sup>5CV</sup> de cellules mSP, transduites par un lentivirus contenant une séquence de microdystrophine ou de GFP, permet quant à elle l'expression du transgène dans 5 à 8% des fibres musculaires (Bachrach et al., 2006).

#### *Cellules PICs*

Les cellules PICs sont des cellules résidentes du muscle, localisées dans l'interstitium, et caractérisées comme étant positives pour le médiateur de stress cellulaire PW1 et négatives pour le facteur de régulation myogénique Pax7 (Mitchell et al., 2010). Elles n'expriment pas les marqueurs MyoD, sma, CD31 et F4/80 et se distinguent ainsi des cellules des muscles squelettiques et lisses, des cellules endothéliales et des macrophages. Cette population a été isolée à partir de muscle de souris sur la base d'un tri cellulaire. Suite à l'élimination des érythrocytes (Ter119<sup>high</sup>) et des cellules hématopoïétiques (CD45<sup>+</sup>), les cellules PICs sont identifiées dans la fraction cellulaire Sca1<sup>med</sup>/CD34<sup>+</sup>, avec un enrichissement de plus de 80%

(Mitchell et al., 2010). Ces cellules présentent une forte capacité de différenciation myogénique *in vitro*, générant à la fois du muscle strié squelettique et du muscle lisse. Leur injection dans le muscle *Tibialis anterior* lésé de souris *nude* a montré qu'elles participent à la formation de fibres musculaires. Une partie des cellules injectées est retrouvée dans l'interstitium, suggérant un auto-renouvellement de ces cellules.

Les cellules PICs se distinguent des cellules satellites par leur localisation interstielle, leur absence d'expression de Pax7, mais également par leur profil d'expression génique (Pannérec et al., 2013). Les cellules PICs expriment de nombreux gènes communs avec les CSM tandis que les cellules satellites expriment des gènes inhérents à un progéniteur myogénique engagé. De plus, une sous-population des cellules PICs, exprimant PDGFR $\alpha$ , possède un potentiel adipogénique tandis que les cellules satellites sont restreintes à un potentiel myogénique.

Une récente étude a reporté l'isolement de cellules PICs à partir du muscle squelettique de porcs juvéniles et a démontré leur multipotence par une capacité de différenciation en muscle squelettique, muscle lisse, cellules endothéliales et cellules « cardiomyocytes-like » (Lewis et al., 2014).

En 1996, Relaix *et al.* avaient identifié PW1 comme étant exprimé dans les cellules myogéniques de l'embryon avant les facteurs MRFs (Relaix et al., 1996). PW1 est alors décrit comme un facteur de transcription initialement exprimé précocement au cours du développement, dans toutes les cellules mésodermes, mais dont l'expression est maintenue dans le muscle squelettique différencié adulte lui suggérant un rôle spécifique dans le muscle (Nicolas et al., 2005). Un modèle transgénique de souris a permis de montrer que PW1 est exprimé par les cellules souches ou progénitrices, capables d'auto-renouvellement, de nombreux tissus adultes tels que l'intestin, le système nerveux central, l'épiderme, les testicules, l'os et le muscle squelettique (Besson et al., 2011). PW1 est donc proposé comme un marqueur important pouvant permettre un isolement rapide de ces cellules.

#### *Cellules CD133+*

Les cellules CD133<sup>+</sup> représentent une sous-population de cellules circulantes exprimant AC133, un marqueur des cellules souches hématopoïétiques. Les cellules CD133<sup>+</sup> fraîchement isolées de sang humain expriment CD34, CD45 et le marqueur Thy-1 mais également les marqueurs myogéniques Pax7, Myf5, MyoD, M-cadhérine, MRF4 et myogénine (Torrente et al., 2004). Elles sont capables de différenciation myogénique *in vitro* lorsqu'elles sont co-cultivées avec des myoblastes C2C12 ou des fibroblastes exprimant Wnt.

Lorsqu'elles sont injectées en intra-artériel ou bien en intramusculaire chez la souris SCID-*mdx*, ces cellules peuvent fusionner avec les fibres pour participer à la régénération musculaire et augmenter la force musculaire (Torrente et al., 2004). De plus, elles ramènent une expression de dystrophine (jusqu'à 10% des fibres) et peuvent être retrouvées en position satellitaire, sous la lame basale, suggérant qu'elles peuvent reconstituer la niche satellitaire.

Les cellules CD133<sup>+</sup> peuvent également être isolées à partir de muscle humain et elles présentent une meilleure capacité régénérative que les myoblastes humains une fois injectées dans un muscle cryolésé de souris immunodéficiente (Negroni et al., 2009). En effet, les cellules CD133<sup>+</sup> humaines forment plus de fibres musculaires humaines, sont retrouvées plus nombreuses en position satellitaire et montre une meilleure dispersion dans le muscle injecté. Meng et *al.* confirment la participation de cellules CD133<sup>+</sup> humaines à la régénération musculaire après injection intramusculaire chez la souris immunodéficiente et montrent qu'elles permettent d'apporter des cellules satellites fonctionnelles (Meng et al., 2014). Une étude a montré que des cellules CD133<sup>+</sup> isolées à partir de muscle de patients DMD et génétiquement corrigées par exon skipping permettent, après injection intramusculaire ou intra-artérielle chez la souris SCID/*mdx*, une expression de dystrophine et une amélioration de la force musculaire (Benchaouir et al., 2007). Ces résultats soulignent une possible stratégie de transplantation autologue des cellules CD133<sup>+</sup>. Une récente étude a précisé la localisation des cellules CD133<sup>+</sup>, de sujets sains et de patients DMD, dans le muscle squelettique humain, et il s'avère qu'elles peuvent être présentes en position interstitielle ou bien en périphérie de la fibre musculaire, sous la lame basale (Meng et al., 2014).

Torrente et *al.* ont testé la sécurité de la transplantation autologue de cellules CD133<sup>+</sup> dérivées de muscle chez 8 garçons DMD sur une période de 7 mois, lors d'un essai clinique de phase I (Torrente et al., 2007). Suite à l'évaluation de la force musculaire, de la fonction cardiaque et pulmonaire, aucun effet secondaire n'a été observé chez les patients transplantés. Cette étude a également révélé une augmentation du nombre de capillaires par fibre musculaire et une conversion de fibres lentes en fibres rapides suite à l'injection des cellules CD133<sup>+</sup>.

Les cellules CD133<sup>+</sup> représentent 1% de la population totale de cellules mononucléées du muscle (Benchaouir et al., 2007) et semblent survivre difficilement à un tri cellulaire par FACS (Meng et al., 2014). Ainsi l'expansion de ces cellules en culture semble être primordiale. Cependant, leur expansion *in vitro* s'avère difficile (Belicchi et al., 2010) et ceci

pourrait constituer une limitation possible à leur utilisation en clinique. L'optimisation de l'expansion des cellules CD133<sup>+</sup> en culture semble être un enjeu majeur (Belicchi et al., 2010; Meng et al., 2014).

#### *Cellules souches dérivées du muscle (MDSC)*

L'équipe de Johnny Huard a mis au point en 1998 une technique de préplating permettant d'isoler différentes populations de cellules dérivées du muscle de souris (Qu et al., 1998) sur la base d'un protocole qui était déjà décrit pour purifier les myoblastes de souris à partir de cultures primaires (Rando and Blau, 1994). La technique de préplating consiste en un transfert de surnageant successif, permettant de réensemencer à chaque étape les cellules non adhérentes. Six populations de cellules dérivées du muscle ont ainsi été isolées, de pp1 à pp6 (Figure 10). La caractérisation de ces populations a démontré un enrichissement en cellules Desmine<sup>+</sup> au cours des différents préplatings (de 7% à pp1 à 78% à pp2). Les derniers préplatings ont montré une meilleure capacité de différenciation *in vitro* ainsi qu'un meilleur taux de survie après transplantation dans le muscle de souris (Qu et al., 1998). La caractérisation des cellules MDSC indique qu'elles sont CD45<sup>-</sup> / M-cadhérine<sup>-</sup> / Flk1<sup>-</sup> / CD34<sup>+</sup> / Sca1<sup>+</sup> / Desmine<sup>+</sup> (Lee et al., 2000; Qu-Petersen et al., 2002). Elles sont également caractérisées par leur forte capacité proliférative *in vitro* et leur multipotence (Qu-Petersen et al., 2002). Elles peuvent se différencier en myotubes mais ont également une capacité de différenciation neurale, hématopoïétique, ostéogénique, adipogénique, chondrogénique et endothéliale (Arsic et al., 2008; Bosch et al.; Deasy et al., 2005; Lee et al., 2000; Peng and Huard, 2004; Qu-Petersen et al., 2002; Torrente et al., 2001).

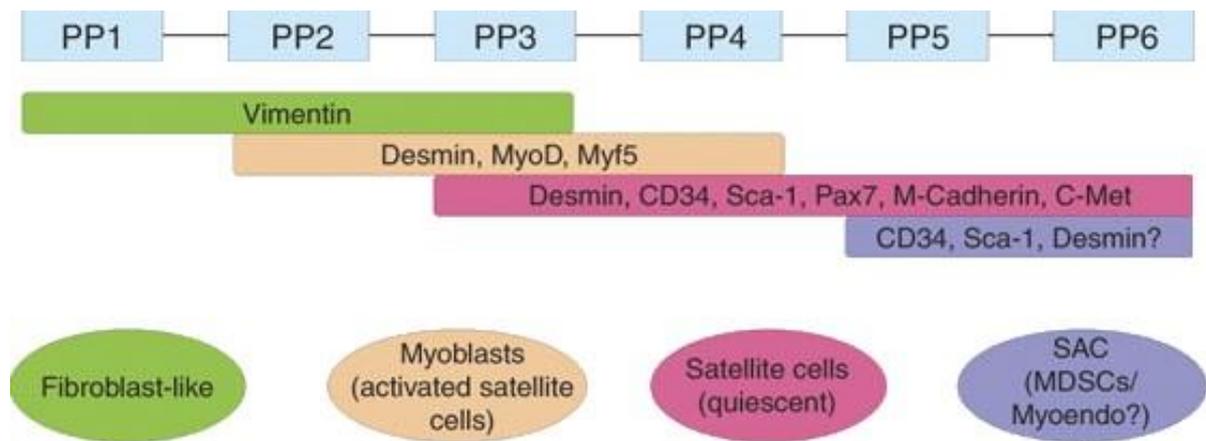


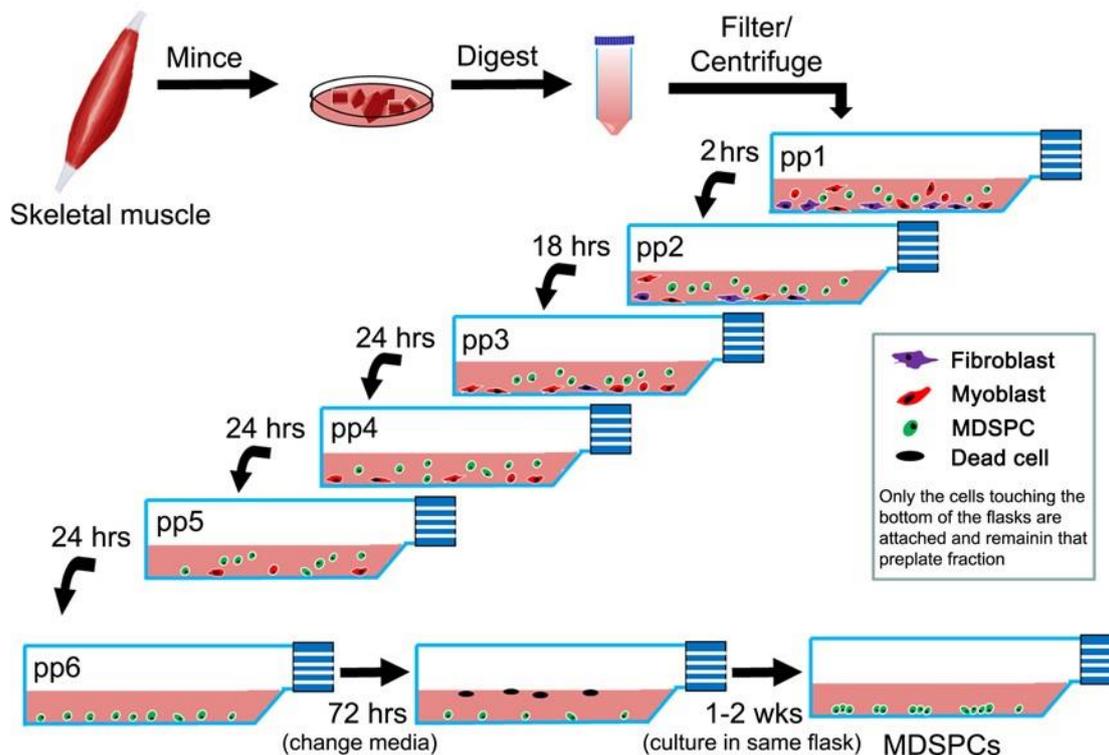
Figure 10 **Identification des populations à l'issu du protocole de préplating**

D'après Gharaibeh et al., 2008.

Plusieurs équipes ont montré qu'après transplantation locale ou systémique chez la souris *mdx*, les cellules MDSC participent à la régénération musculaire (Deasy et al., 2005; Qu-Petersen et al., 2002; Torrente et al., 2001).

Des cellules MDSC ont pu être isolées ces deux dernières années à partir de muscle strié squelettique humain sur la base de leur adhérence tardive aux supports de culture avec une surface de collagène (Chirieleison et al., 2012; Lavasani et al., 2013) (Figure 11). Ces cellules sont capables de se différencier en myotubes *in vitro* cependant, suite à leur injection dans le muscle de souris SCID/*mdx*, elles ne permettent pas de restaurer l'expression de dystrophine et ne participent pas à la formation de nouvelles myofibres, malgré leur capacité à fusionner avec les myofibres de la souris.

Sur la base d'une adaptation du protocole de preplating, une fraction marginale de cellules non adhérentes a été isolée à partir de muscle de chien sain. Ces cellules, nommées cellules MuStem, montrent une grande capacité d'expansion *in vitro* associée à une forte clonogénicité. Phénotypiquement, les cellules MuStem correspondent à des progéniteurs myogéniques précoces. Cultivées avec des milieux d'induction spécifiques, elles se différencient en cellules myogénique, adipogénique et ostéogénique, révélant une oligopotence. De façon importante, leur injection systémique induit une réexpression de dystrophine, une correction des dommages musculaires et une amélioration clinique notable, observée plus de deux ans après la transplantation (Rouger et al., 2011).



**Figure 11 Isolement de cellules souches et progéniteurs cellulaires dérivés du muscle squelettique humain (MDSPC)**

Le muscle squelettique est mécaniquement et enzymatiquement dissocié. Les cellules musculaires sont resuspendues dans un milieu de prolifération et ensemencées en flasque. Les différentes populations de cellules dérivées du muscle sont isolées selon leur caractéristique d'adhésion. Les cellules du préplating 1 (pp1) adhèrent en 2 H et constituent principalement les fibroblastes primaires. Les préplatings suivants (pp2-5) contiennent à la fois des fibroblastes et des myoblastes. Les cellules pp6 adhèrent en 72 H. La plupart des cellules pp6 meurent pendant les premiers temps de culture (1 à 2 semaines) et les quelques rares cellules qui adhèrent survivent et prolifèrent pour former des colonies. Ce sont ces cellules qui sont appelées MDSPCs. (Lavasani et al., 2013)

Du fait de leur procédure d'isolement prolongé qui peut modifier le phénotype cellulaire en culture, il est difficile de tracer l'origine des cellules *MDSC in vivo* sur la base de marqueurs de surface (Yin et al., 2013). En l'attente d'une détermination de la localisation physiologique des cellules MDSC, certaines études proposent qu'elles proviennent de la moelle osseuse et résident dans le muscle tandis que d'autres vont dans le sens d'une origine musculaire (Deasy et al., 2001, 2005; Issarachai et al., 2002).

#### D. Cellules non résidentes du muscle

La moelle osseuse adulte contient des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et des cellules stromales, les cellules souches mésenchymateuses (CSM). A ce jour, les progéniteurs cellulaires de la moelle osseuse qui contribuent à la régénération cellulaire ne sont pas clairement identifiés (Yin et al., 2013).

### *Cellules souches hématopoïétiques (CSH)*

Les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse sont isolées par les marqueurs cellulaires c-Kit<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> ou CD45<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> ou CD45<sup>+</sup>/c-Kit<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>. Il a été montré que des cellules isolées à partir d'une unique cellule CD45<sup>+</sup> sont capables de participer à la régénération musculaire dans le muscle de souris lésé à la cardiotoxine, par l'intermédiaire des cellules myéloïdes matures, mais ne permettent pas de repeupler la niche satellitaire (Camargo et al., 2003). Des résultats similaires ont été obtenus avec des cellules c-Kit<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup> (une sous-population de la SP), bien que Yoshimoto et al. leur attribuent en plus la possibilité de conversion en cellules satellites (Corbel et al., 2003; Yoshimoto et al., 2005). Une étude suggère que les cellules CD45<sup>+</sup> seraient mobilisées lors de la régénération musculaire par la voie de signalisation Wnt (Polesskaya et al., 2003). La transplantation allogénique de CSH chez le chien dystrophique, par voie intraveineuse ou intramusculaire, ne permet cependant pas de restaurer l'expression de dystrophine ni de reconstituer une réserve de cellules satellites (Dell'Agnola et al., 2004; Kuhr et al., 2007).

### *Cellules souches mésenchymateuses (CSM)*

Les CSM sont des cellules stromales non-hématopoïétiques caractérisées par leur capacité d'adhérence au plastique, l'expression de marqueurs phénotypiques non spécifiques et leur potentiel de différenciation en cellules de la voie mésodermique (Horwitz et al., 2005; Roux et al., 2011). Outre la moelle osseuse, les cellules stromales mésenchymateuses sont également présentes dans le tissu adipeux, le liquide amniotique, le sang de cordon, les tissus fœtaux, le muscle squelettique, la pulpe dentaire (Augello et al., 2010; Salem and Thiernemann, 2010). Elles expriment les marqueurs de surface CD90, CD73, CD105 mais n'expriment pas les marqueurs hématopoïétiques CD34, CD45, CD14. Les antigènes CD200, SSEA-4 (pour Stage-specific embryonic antigen-4) et CD49a permettent d'enrichir significativement la population de cellules stromales mésenchymateuses issues de la moelle osseuse (Delorme et al., 2008; Gang et al., 2007; Rider et al., 2007). Les CSM sont capables de se différencier en ostéoblastes, adipocytes, chondrocytes et muscle squelettique (Caplan, 1991; Prockop, 1997).

La transplantation de MSC murines, marquées avec un transgène nLacZ, dans le muscle *Tibialis anterior* lésé de souris SCID/bg a montré que ces cellules sont capables de migrer et de participer à la formation de nouvelles fibres musculaires après deux semaines (Ferrari et al., 1998). Des cellules MSC Flk-1<sup>+</sup> murines isolées à partir du tissu adipeux et injectées dans la

veine caudale de souris *mdx* ont également permis de participer à la régénération musculaire et de restaurer partiellement l'expression de dystrophine (Liu et al., 2007b).

En 2005, Dezawa *et al.* ont rapporté la transplantation de M-MSC (muscle-MSCs) clonales humaines, marquées à la GFP, par injection intramusculaire ou intraveineuse, chez des rats ou souris *mdx-nude* dont les muscles gastrocnémiens ont été préalablement lésés. Deux semaines après la transplantation, une expression de GFP est retrouvée dans des fibres nouvellement formées, qui expriment alors la dystrophine humaine, démontrant ainsi que les M-MSC clonales sont capables de s'implanter dans un muscle endommagé et de participer à la régénération musculaire (Dezawa et al., 2005). Shi *et al.* ont obtenu des résultats similaires suite à l'injection de MSC humaines dans un muscle *Tibialis anterior* en régénération de souris *nod/SCID* (Shi et al., 2004). En 2012, Nitahara-Kasahara *et al.* ont décrit pour la première fois la transplantation de cellules MSC CD271<sup>+</sup> canines par voie intra-artérielle chez des chiens « wild-type » dans un contexte de régénération induite. Ils ont montré que ces cellules, qui ont été transduites par un adénovirus exprimant MyoD, ont survécu 8 semaines après l'injection et ont participé à la régénération musculaire (Nitahara-Kasahara et al., 2012). Les auteurs ont également démontré la survie de ces cellules 12 semaines après leur injection dans le *Tibialis anterior* de chiens *CXMDJ* non immunosupprimés. Bien que le nombre de cellules exprimant la dystrophine reste faible, les myofibres nouvellement formées dérivant des cellules injectées expriment la myosine développementale. De manière intéressante, il a également été démontré que des cellules MSC humaines et porcines, injectées par voie intramusculaire, chez un modèle de hamster dystrophique non-immunosupprimé permettent de participer à la régénération musculaire sans engendrer de réponse inflammatoire (Shabbir et al., 2009).

Dans un contexte de transplantation, les cellules MSC sont intéressantes par leur capacité à fusionner avec le muscle dystrophique, les propriétés anti-inflammatoires qui leurs sont attribuées et leur capacité à produire des facteurs trophiques permettant d'augmenter l'activité des cellules réparatrices endogènes (Ichim et al., 2010).

*Ces dernières années, peu d'essais cliniques de thérapie cellulaire de la DMD ont été initiés mais de nombreuses études ont été conduites afin d'identifier les populations cellulaires candidates, de les modifier génétiquement, de se diriger vers une administration systémique des cellules ou bien de promouvoir leur intégration dans le muscle. Toutes ces*

*recherches ont pour but de faire les meilleurs choix stratégiques en vue de futurs essais cliniques.*

### **2.3.4 Impact de la niche sur le comportement de la cellule souche**

L'hypothèse de la « niche » des cellules souches est évoquée pour la première fois en 1978 par Schofield et repose sur une dépendance des cellules souches à leur micro-environnement. Le postulat est qu'« *il n'y a pas de cellule qui soit intrinsèquement cellule souche mais plutôt une diversité de cellules dans le tissu qui possèdent le potentiel de cellule souche à un degré plus ou moins important* » (Schofield, 1978).

La niche est définie généralement comme le micro-environnement dans lequel résident les cellules souches spécifiques d'un tissu. La niche des cellules souches est composée d'un ensemble de cellules dans un tissu donné. Sa structure dans l'ensemble est variable et différents types cellulaires peuvent assurer la niche. La niche est un endroit privilégié pour les cellules souches où elles reçoivent divers signaux environnementaux (cytokines, ROS, teneur en oxygène...) (Urao and Ushio-Fukai, 2013) et établissent des contacts par l'intermédiaire de molécules d'adhésion telles que les intégrines qui peuvent aider leur ancrage à la MEC (Li and Xie, 2005). Le micro-environnement est ainsi présenté comme un composant majeur du système de la cellule souche, sans lequel les cellules souches ne peuvent être maintenues (Schofield, 1983).

#### **2.3.4.1 Niche satellitaire**

Les cellules satellites sont localisées entre le sarcolemme de la myofibre et la lame basale où elles sont en état de quiescence (Boonen and Post, 2008). La niche satellitaire est alors directement délimitée par la lame basale et la myofibre adjacente différenciée. Ainsi, les signaux mécaniques, électriques et chimiques de la myofibre adjacente et de la membrane basale, composant de la MEC, sont impliqués dans la régulation des cellules satellites. L'attachement de la cellule satellite à sa niche est établi par son interaction avec la membrane basale et les interactions avec les autres cellules. Le côté basal des cellules satellites exprime l'intégrine  $\alpha7\beta1$  qui lie le cytosquelette à la laminine de la lame basale et le côté apical exprime la M-cadhérine qui relie la cellule satellite à sa myofibre adjacente. Ces deux points d'ancrage sont essentiels à la transduction du signal entre la cellule satellite et ses structures adjacentes. Les intégrines peuvent aussi influencer la migration cellulaire, la morphologie des cellules et les interactions cellulaires (Kovanen, 2002).

Le comportement de la cellule satellite est également influencé par des facteurs sécrétés provenant des cellules environnantes telles que les cellules interstitielles, les capillaires, la jonction neuromusculaire et les cellules immunitaires (Figure 12). La microvascularisation semble jouer un rôle majeur puisque la majorité des cellules satellites est localisée à moins de 5  $\mu\text{m}$  des capillaires ou des cellules endothéliales vasculaires, ce qui suggère une communication privilégiée entre les cellules satellites et les cellules endothéliales (Ten Broek et al., 2010; Christov et al., 2007). Les macrophages ont également un rôle dans la régénération du muscle squelettique puisqu'ils peuvent protéger les cellules satellites de l'apoptose en sécrétant des facteurs solubles ou bien en interagissant par contact direct cellule-cellule (Chazaud et al., 2003). Ils ont cependant un double rôle : ils peuvent être pro-inflammatoires et induire la prolifération des précurseurs myogéniques ou bien anti-inflammatoires et induire leur différenciation et fusion (Chazaud et al., 2009).

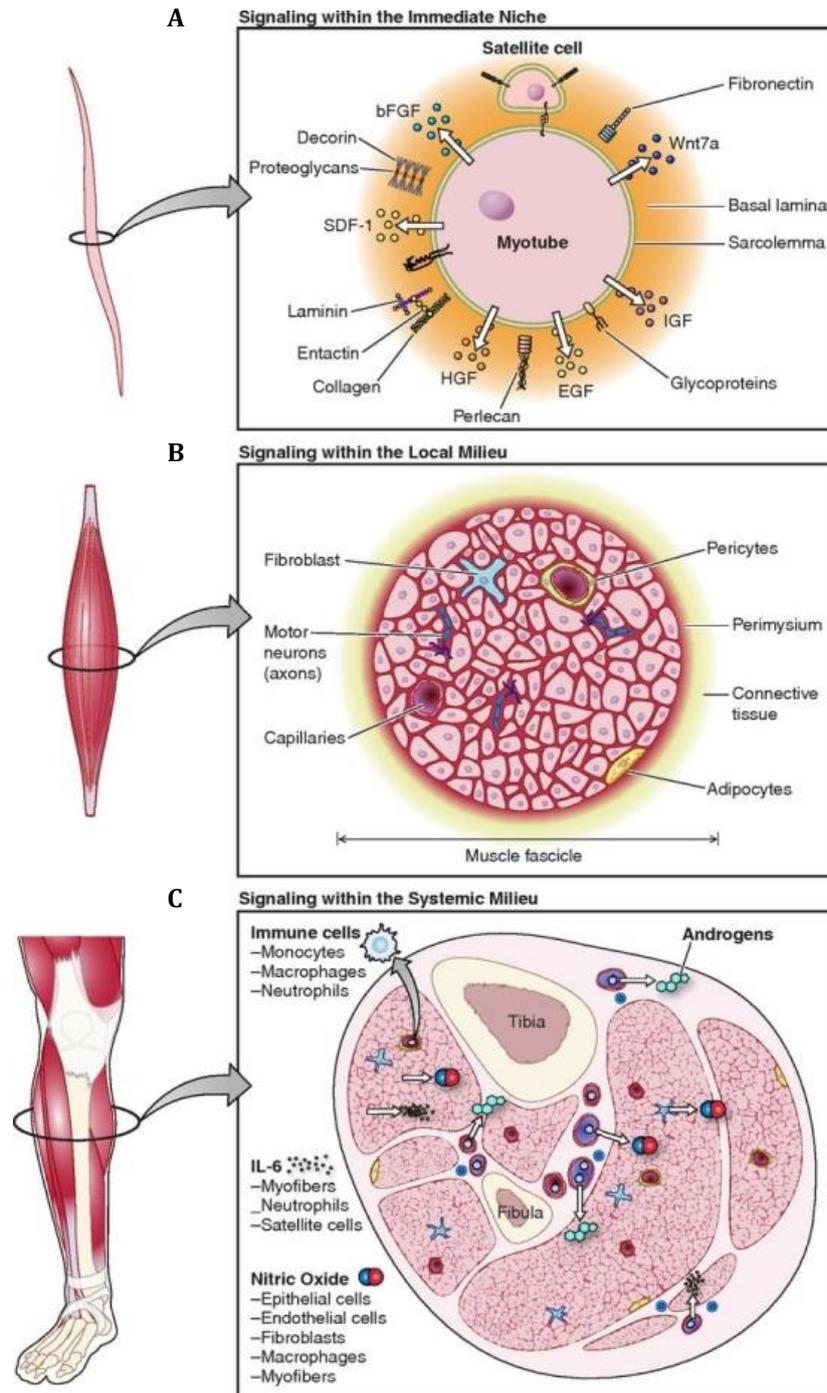


Figure 12 Niche des cellules satellites

(A) **La niche immédiate de la cellule satellite** : Les cellules satellites résident entre la lame basale et le sarcolemme des myofibres et sont influencées par leur micro-environnement. Un ensemble de molécules diffusibles telles que Wnt, IGF ou FGF est échangé entre la cellule satellite et la myofibre pour maintenir son état de quiescence ou bien l'activer. La niche immédiate est également constituée de nombreux composants de la matrice extracellulaire et de récepteurs cellulaires. (B) **Le milieu local** : Il entoure la cellule satellite et est composé de myofibres, cellules interstitielles, capillaires et jonctions neuromusculaires. (C) **Le milieu systémique** : Les cellules satellites sont exposées au système immunitaire et aux hormones circulantes. (Yin et al., 2013)

#### 2.3.4.2 Facteurs environnementaux

##### A. Réponse aux cytokines/chemokines

De nombreux facteurs de croissance tels que HGF (Hepatocyte Growth Factor), FGF-2 et -6 (Fibroblast Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), SDF-1 et IGF-1 et -2 jouent un rôle important dans la prolifération et la différenciation des myoblastes (Yin et al., 2013). IGF-1 est notamment un des principaux facteurs de croissance impliqué dans la régénération musculaire (Sato et al., 2003). VEGF peut également favoriser la régénération musculaire en stimulant l'angiogenèse pour permettre un meilleur apport en nutriments et oxygène (O<sub>2</sub>) (Shimizu-Motohashi and Asakura, 2014). Il a été démontré qu'une surexpression de VEGF par un adénovirus peut favoriser la régénération des myofibres *in vivo*, dans un muscle de souris endommagé, et ce de façon dose-dépendante (Arsic et al., 2004). VEGF et ses récepteurs sont retrouvés exprimés par des cellules satellites et des lignées de myoblastes C2C12 en culture. Par ailleurs, VEGF peut agir de façon autocrine en stimulant la migration des myoblastes et en prévenant l'apoptose de myoblastes en différenciation (Germani et al., 2003). SDF-1 est un chémo-attractant, sécrété par la myofibre adjacente mais aussi par la moëlle osseuse, qui se lie au récepteur CXCR4 des cellules satellites et favorise leur migration cellulaire (Brzoska et al., 2012; Ratajczak et al., 2003).

##### B. Réponse au stress oxydatif

Le stress oxydatif est une source majeure de dommage cellulaire. De nombreuses études montrent que les cellules souches possèdent des capacités anti-oxydantes élevées (Dernbach et al., 2004; He et al., 2004) tandis que d'autres démontrent un impact délétère du stress inflammatoire et oxydatif sur la transplantation de cellules et notamment des myoblastes (Qu, 1998; Suzuki et al., 2000). Les cellules satellites présentent des niveaux élevés de transcrits de gènes impliqués dans le contrôle de la cytotoxicité des ROS tels que les gènes des enzymes sulfiredoxine (*Srxn*), thiorédoxine reductase (*Txnrd1*) et glutathione peroxidase (*Gpx3*) qui retiennent les radicaux libres de l'O<sub>2</sub> (Montarras et al., 2013; Pallafacchina et al., 2010). Par ailleurs, les MDSC, qui démontrent une meilleure capacité régénérative que les myoblastes (Qu-Petersen et al., 2002), ont une capacité anti-oxydante plus importante du fait d'un taux plus élevé de superoxyde dismutase (SOD) et glutathione (GSH) ce qui leur confère une capacité de survie plus importante après transplantation (Urish et al., 2009). Cet avantage de survie des MDSC est perdu quand les taux de GSH sont diminués par un inhibiteur (Urish et al., 2009). Il a notamment été démontré qu'un prétraitement des MDSC avec des agents

pro- ou anti-oxydants impacte le devenir des cellules et affecte la capacité de régénération après transplantation (Drowley et al., 2010).

L'activité des aldéhydes déshydrogénases (ALDH) joue également un rôle important dans la résistance au stress oxydatif. Les ALDH sont une famille d'enzymes qui oxydent et détoxifient les produits aldéhydiques de la peroxydation des lipides qui sont initialement générés par les ROS. Il a été démontré l'existence de deux sous-populations de cellules dans le muscle humain sur la base de leur taux d'activité ALDH (Jean et al., 2011; Vauchez et al., 2009). Les myoblastes qui montrent une forte activité ALDH sont décrits comme plus résistants à la mortalité cellulaire lorsqu'ils sont exposés *in vitro* à l' $H_2O_2$  (Jean et al., 2011). De plus, une forte activité ALDH semble conférer un avantage de survie aux myoblastes humains lors de transplantations cellulaires chez la souris SCID. L'ALDH est ainsi présentée comme un marqueur de sélection d'une sous-population de cellules souches présentant des propriétés intéressantes de résistance, notamment au stress oxydatif. Une autre étude propose l'utilisation de l'ALDH comme marqueur d'isolement rapide de progéniteurs myogéniques pour la thérapie cellulaire (Vella et al., 2011a).

### C. Impact de la teneur en oxygène

Les niches propres à chaque population de cellules souches sont de mieux en mieux décrites et de nombreuses études s'intéressent à la teneur en  $O_2$  de l'environnement immédiat de la cellule. Des mesures de la pression partielle en  $O_2$  ( $pO_2$ ) des tissus au cours du développement embryonnaire chez le rat et l'Homme ont montré qu'ils présentent de très faibles teneurs en  $O_2$ , avec des  $pO_2$  comprises entre 25,7 mm Hg et 47,6 mm Hg (Mitchell and Yochim, 1968; Rodesch et al., 1992). Les ESPC (embryonic stem and progenitor cells) occupent donc une « niche hypoxique » et la faible teneur en  $O_2$  permet de réguler leur différenciation (Simon and Keith, 2008). Les tissus adultes présentent également des concentrations en  $O_2$  plus faibles que celle atmosphérique qui s'élève à 20%. Les niches des CSH, CSM et cellules neurales enregistrent des tensions en  $O_2$  allant de 1 à 8% (environ 14-65 mm Hg) (Mohyeldin et al., 2010; Nombela-Arrieta et al., 2013) (Figure 13). Dans le muscle squelettique, les cellules souches sont également exposées à des teneurs en  $O_2$  allant de 1 à 10% (Greenbaum et al., 1997; Richardson, 1998).

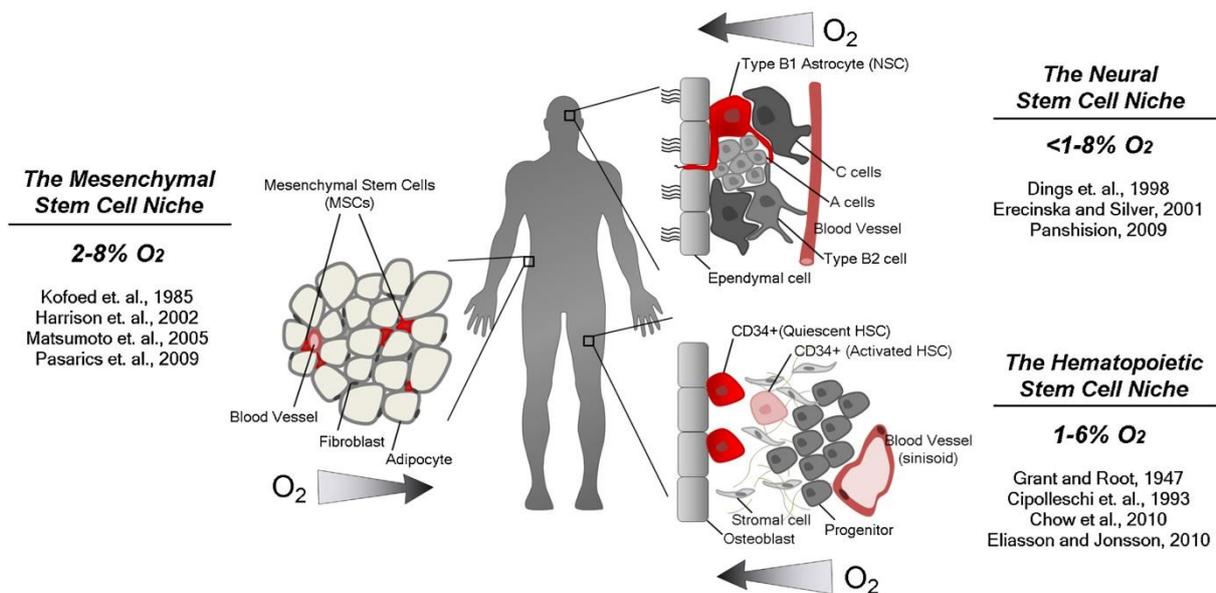


Figure 13 Tension en oxygène dans divers compartiments de cellules souches

Les CSH, CSM et cellules neurales sont soumises à des tensions en O<sub>2</sub> allant de 1 à 8% dans leurs niches respectives : la moëlle osseuse, le tissu adipeux et la zone subventriculaire. (Mohyeldin et al., 2010)

*In vitro*, selon les conditions standards, les cultures cellulaires sont placées à une concentration atmosphérique en O<sub>2</sub> de 20-21%. Or, de nombreuses études démontrent que les cellules répondent différemment à une concentration en O<sub>2</sub> atmosphérique par rapport à des teneurs en O<sub>2</sub> plus faibles qui reflètent davantage la situation physiologique (Csete, 2005). Une concentration en O<sub>2</sub> de 20% serait même un stress pour la cellule et induirait un état « hyperoxique ». Ainsi, ce qui est considéré par la communauté scientifique comme condition hypoxique constituerait en réalité une normoxie tissulaire (Ivanovic, 2009). Un phénotype hypoxique correspond donc à un état primaire de la cellule plutôt qu'à une adaptation (Ivanovic, 2013).

Différentes études montrent que l'hypoxie permet de maintenir dans un état indifférencié de nombreuses populations de cellules souches telles que les CSM, les ASC (adipose-derived stem cells), les PDLCs (periodontal ligament cells) et DPCs (dental pulp cells) (Choi et al., 2014; Hung et al., 2012; Zhou et al., 2014). Des teneurs en O<sub>2</sub> inférieures à 5% induisent sur ces cellules souches une augmentation d'expression des facteurs de pluripotence Oct4, Sox2, Nanog et Klf4. Les facteurs induits par l'hypoxie (HIFs pour hypoxia inducible factors), agissent directement sur ces facteurs de transcription impliqués dans l'auto-renouvellement et la pluripotence. Ainsi, HIF-2 $\alpha$  est connu pour réguler Oct4, Sox2 et Nanog (Covello et al.,

2006; Forristal et al., 2010). Il a été démontré qu'une teneur en O<sub>2</sub> de 1% inhibe la différenciation de cellules souches neurales, de cellules C2C12 et de cellules satellites par la voie Notch (Gustafsson et al., 2005). L'hypoxie peut également favoriser la reprogrammation des fibroblastes en cellules iPS (Mathieu et al., 2014; Yoshida et al., 2009). De manière intéressante, un taux d'O<sub>2</sub> de 2% peut pousser des cellules hESCs ou iPSCs ayant initié un processus d'engagement à un retour vers un état pluripotent (Mathieu et al., 2013). Les cellules ainsi « dé-différenciées » présentent une morphologie, une capacité d'auto-renouvellement, un profil d'expression génique et une signature de miRNAs semblables aux cellules hESCs. De récentes études sur les CSH proposent que le switch entre l'état précurseur et l'état différencié ferait intervenir un autre état intermédiaire nommé « métastable » (Chang et al., 2008; Huang et al., 2007). Il est donc possible que des cellules hESCs précocement engagées se trouvent dans un état réversible où elles expriment des marqueurs de différenciation mais sont encore capables de ré-entrer en pluripotence sous certaines conditions. Mathieu et *al.* proposent l'hypothèse de la niche hypoxique où la détermination du devenir cellulaire est influencé par l'hypoxie (Mathieu et al., 2013) (Figure 14).

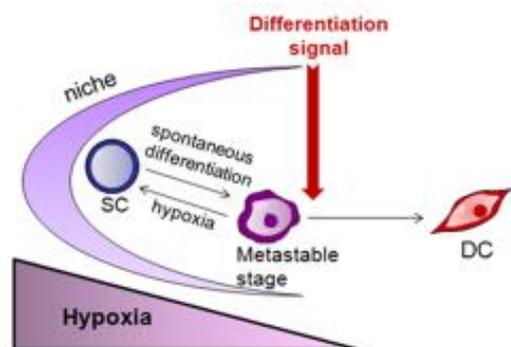


Figure 14 **Hypothèse de la niche hypoxique**

Les cellules souches résident dans une niche hypoxique qui maintient leur capacité d'auto-renouvellement. La faible teneur en O<sub>2</sub> permet de retenir à l'état souche une cellule qui se dirigerait spontanément vers la différenciation. Seul un signal fort peut alors induire la différenciation des cellules (DC). (Mathieu et al., 2013)

L'hypoxie a également un impact sur la prolifération et la migration cellulaire (Figure 15). Des CSM migrent plus rapidement et ont une meilleure capacité de prolifération lorsqu'elles sont placées en culture à 1% d'O<sub>2</sub> (Hung et al., 2012). L'hypoxie augmente ainsi l'efficacité d'expansion des CSM mais permet également de diminuer leur sénescence en régulant négativement E2A-p21 par HIF-TWIST (Tsai et al., 2011) (Figure 15).

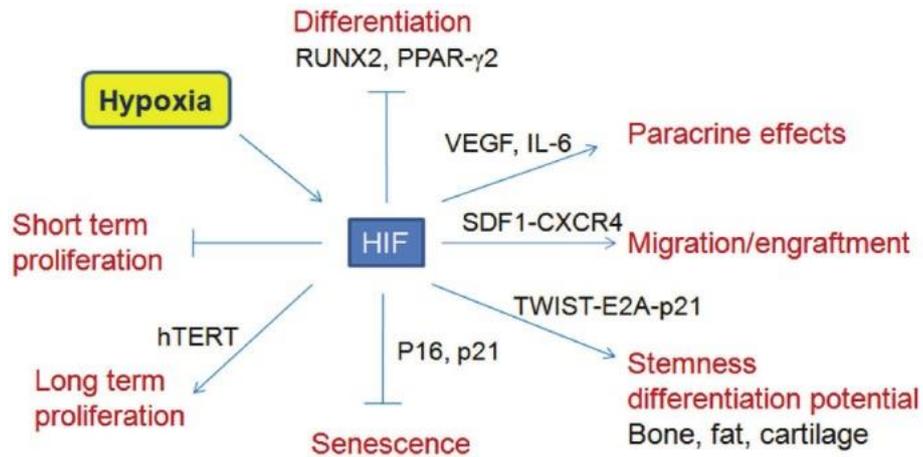


Figure 15 Effets de l'hypoxie décrits sur les cellules souches mésenchymateuses

L'hypoxie impacte la prolifération, la différenciation, la migration, la greffe des cellules et les propriétés de cellule souche des CSM. (Tsai et al., 2012a)

Des CSM cultivées en condition hypoxique surexpriment le VEGF, la chémokine SDF-1 et son récepteur CXCR4 qui jouent un rôle important pour la migration cellulaire (Huang et al., 2014). Des tests de migration *in vitro* (scratch assay) montrent une augmentation significative de la migration de CSM soumises à des taux d'O<sub>2</sub> de 1 à 3% (Hung et al., 2012; Rosová et al., 2008). *In vivo*, le taux de CSM circulantes est clairement augmenté chez des rats exposés de manière chronique à l'hypoxie (Rocheffort et al., 2006). Un préconditionnement hypoxique de cellules est ainsi envisagé avant transplantation (Muscarì et al., 2013). Des CSM cultivées en condition hypoxique (<3%) et injectées en intra-artériel dans un modèle murin d'ischémie ont ainsi montré un meilleur potentiel régénératif (Rosová et al., 2008). Un préconditionnement hypoxique de CSM agit également sur le métabolisme du glycogène par les voies PI3K/AKT, HIF-1/GSK-3β, ce qui augmente la survie cellulaire et l'efficacité thérapeutique dans un contexte ischémique (Zhu et al., 2014).

Les cellules souches du muscle squelettique semblent particulièrement résistantes à des taux d'O<sub>2</sub> extrêmement faibles puisque des cellules myogéniques viables ont pu être prélevées à partir de biopsies de cadavres humains 17 jours post-mortem et chez la souris 14 jours post-mortem. Ces cellules ont par ailleurs montré une capacité régénérative suite à leur injection dans le *Tibialis anterior* lésé de souris (Latil et al., 2012). Les cellules souches musculaires Pax7<sup>+</sup> présentent une meilleure viabilité cellulaire dans les tissus post-mortem de souris et sont enrichies en comparaison aux autres cellules. Leur survie est liée au fait qu'elles se mettent en quiescence et adoptent un état de dormance caractérisé par une réduction de

l'activité métabolique, une augmentation des ROS et un statut transcriptionnel plus proche de cellules primitives. Il a également été démontré que l'hypoxie favorise l'état de quiescence des progéniteurs myogéniques en culture et leur auto-renouvellement. De plus, le préconditionnement hypoxique des myoblastes favorise l'efficacité de leur transplantation dans le *Tibialis anterior* de souris *mdx* (Liu et al., 2012b).

## Chapitre 3. Outils d'exploration par des approches à haut débit

### 3.1 Apport des approches « haut débit »

#### 3.1.1 Etudes « omiques » et physiopathologie de la DMD

Bien que les conséquences directes de l'absence de dystrophine dans le muscle soient bien décrites (cf partie 1.3.3.1), les mécanismes cellulaires associés à la physiopathologie de la DMD restent à ce jour encore partiellement à élucider. Les études transcriptomiques et protéomiques permettent une exploration sans a priori et complètent les approches ciblées plus classiques, notamment d'histologie. L'apport des techniques à haut débit facilite la recherche des dérégulations moléculaires impliquées dans les cascades physiopathologiques de la DMD et renseigne sur les conséquences secondaires de l'absence de dystrophine. Différentes études « omiques » ont permis de dégager de grandes voies dérégulées au cours de la DMD qui sont détaillées ici.

##### 3.1.1.1 Homéostasie ionique

Dans un muscle dystrophique, la rupture du complexe DAPC augmente la susceptibilité au stress mécanique et augmente la perméabilité aux ions tels que le  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Na}^{2+}$ . De nombreuses études rapportent une élévation chronique de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  sous le sarcolemme, ou dans d'autres compartiments intracellulaires, dans les fibres musculaires squelettiques ou bien les myotubes de souris *mdx* et de patients DMD (Brown, 1997; Mallouk et al., 2000; Robert et al., 2001). La perturbation de l'homéostasie ionique, particulièrement sous condition de stress, est considérée comme un élément clé de la pathologie DMD.

Une étude protéomique réalisée sur les protéines liant le calcium par la combinaison d'un gel 2D et d'une identification par spectrométrie de masse a montré une diminution importante de la calséquestrine et de la sarcalumenine dans le muscle squelettique de souris *mdx* en comparaison avec les souris contrôles (Doran et al., 2004). Ces deux protéines situées dans le réticulum sarcoplasmique sont impliquées dans le stockage du calcium. La calséquestrine est une protéine qui permet de constituer un réservoir en calcium de par sa capacité à le séquestrer et agit comme un médiateur du cycle excitation-contraction-relaxation, à la fois en retenant les ions et en régulant le récepteur à la ryanodine. La diminution de ces protéines

dans le muscle dystrophique pourrait être à l'origine d'une moindre séquestration du calcium dans le réticulum sarcoplasmique et donc d'une augmentation des niveaux de calcium libre dans le cytosol. En 2006, la même équipe a également montré une diminution de la regucalcine, une autre protéine impliquée dans l'homéostasie calcique, dans les muscles des membres, du diaphragme et du cœur de la souris *mdx* (Doran et al., 2006).

En 2011, Guevel *et al.* ont montré par une étude protéomique quantitative du muscle de chiens GRMD, une altération du niveau de protéines impliquées dans l'homéostasie calcique. Il s'avère que la protéine SERCA2, une pompe à calcium ATPase dépendante, apparaît sous-représentée tandis que les protéines impliquées dans la translocation du  $\text{Ca}^{2+}$  du cytosol au réticulum sarcoplasmique et dans l'homéostasie calcique durant la contraction musculaire sont sur-représentées comme par exemple la calréticuline (Guevel et al., 2011).

#### 3.1.1.2 Métabolisme

Un étude protéomique réalisée par marquage ICAT (Isotope-Coded Affinity Tag) a permis de comparer les profils protéiques du muscle *Vastus lateralis* de chiens GRMD âgés de 4 mois à celui de chiens sains et d'identifier ainsi 84 protéines dérégulées (Guevel et al., 2011). Les protéines moins abondantes dans le muscle dystrophique sont majoritairement des protéines du métabolisme et nous pouvons notamment citer 5 protéines du métabolisme glycolytiques : la pyruvate deshydrogénase, la phosphoglycérate kinase, la phosphoglucomutase, l'énolase et l'adénylate kinase.

Une étude transcriptomique réalisée à partir de muscles de patients DMD âgés de moins de 2 ans a permis de définir les voies de signalisation dérégulées durant la phase présymptomatique de la maladie (Pescatori et al., 2007). Elle a montré que plus de 40 transcrits codant des enzymes impliquées dans le métabolisme du glycogène, la glycolyse, le cycle de Krebs, le transport de lipides et la  $\beta$ -oxydation sont sous-exprimés.

Certains membres de la voie de l'IGF sont surexprimés dans les muscles de patients DMD tels que IGF-1, IGF-2 et quatre protéines régulatrices se liant à l'insuline (IGFBP-2, IGFBP-4, IGFBP-6, IGFBP-7) (Bakay et al., 2002).

#### 3.1.1.3 Réponse inflammatoire/apoptose

Une puce à ADN réalisée chez la souris *mdx* âgée de 8 semaines a révélé que 29,8% des gènes différenciellement exprimés dans ce modèle de DMD sont des gènes impliqués dans l'inflammation (Porter et al., 2002). L'ensemble de ces gènes reflète une réponse

inflammatoire chronique, incluant une expression de cytokines et chémokines, une adhésion leucocytaire et leur diapédèse, une invasion de cellules identifiées par leurs marqueurs spécifiques (cellules mastocytaires, macrophages, lymphocytes T, lymphocytes B) et une activation du complément.

Une réponse inflammatoire a également été décrite chez les patients DMD au cours de la phase initiale de la maladie (Chen et al., 2005; Pescatori et al., 2007). Chen *et al.* ont rapporté une activation précoce de la voie NF- $\kappa$ B par le TLR7 (Toll-Like Receptor 7) puis une activation de la voie du TGF- $\beta$  par l'expression du récepteur de type II au TGF- $\beta$  et de ASK1 (Activation of apoptosis Signal-regulating Kinase 1) par certaines myofibres matures dans les muscles des patients symptomatiques. L'étude de Pescatori *et al.* a démontré une augmentation de l'expression des CMH de classe I et II, des composants du système du complément (C1, C3 et le facteur H), de gènes induits par l'interféron et des marqueurs de cellules immunitaires infiltrantes. L'expression de cytokines telles que CCL14, CCL2, CXCL12 et CXCL14 semble également induite, ce qui participe à la chémoattraction des cellules immunitaires.

#### 3.1.1.4 Régénération

L'étude transcriptomique de Haslett *et al.* a montré une expression différentielle de 105 gènes entre les muscles de sujets sains et ceux de patients DMD. Les gènes impliqués dans les processus de régénération sont surexprimés, reflétant ainsi la chronicité des cycles de nécrose/régénération (Haslett et al., 2002). La régénération musculaire est observée au niveau moléculaire chez les patients DMD par une surexpression des gènes codant des composants des microtubules du cytosquelette, principalement les myosines, des filaments intermédiaires (desmine) et des microfilaments (actine). Une surexpression de gènes codant pour la villine 2 et débrine 1, des protéines interagissant avec l'actine, ainsi que la tubuline et myosine est également observée. De manière intéressante, des gènes habituellement exprimés de manière transitoire au cours du développement musculaire et de la régénération sont surexprimés dans les muscles de patients DMD tels que ceux codant pour les chaînes lourdes de la myosine MYH3 et MYH8 et l'actine cardiaque  $\alpha$ .

Au stade présymptomatique, l'expression des gènes codant les facteurs de transcription myogéniques MyoD, myogénine et MEF2C (myocyte enhancer factor 2C) est augmentée, indiquant une activation diffuse de la myogenèse dans le muscle (Pescatori et al., 2007). La follistatine, IGF-1 et IGF-2, favorisant la myogenèse, sont également augmentés.

*Largement utilisées ces dernières années, les approches globales, protéomiques ou bien transcriptomiques, comparant des muscles dystrophiques à des muscles sains cherchent à identifier de nouveaux biomarqueurs de la DMD. Ces biomarqueurs tissulaires, transcrits ou protéines, reflètent soit des mécanismes primaires liés à l'absence de dystrophine soit des mécanismes secondaires liés au remaniement tissulaire.*

### **3.1.2 Etude des miRNAs dans le muscle squelettique**

#### 3.1.2.1 Définition des miRNAs

Les ARN non codants sont divisés en deux catégories : les ARNs de structure et de régulation. Les premiers comprennent les ARN ribosomiaux, les ARN de transfert, les petits ARN nucléaires ou nucléolaires (rRNAs, tRNAs, snRNAs, snoRNAs respectivement) et sont bien caractérisés au niveau fonctionnel. Les seconds constituent une très large classe d'ARNs, séparés sur la base de leur longueurs : les petits ARNs non codants (sncRNAs) et les longs ARNs non codants (lncRNA) (Erriquez et al., 2013). Les sncRNAs ont une longueur inférieure à 200 nucléotides et les plus caractérisés sont les microARN (miRNAs), les ARN interagissant avec Piwi (piRNAs), les petits ARNs interférants (siRNAs). De nombreuses études présentent désormais les ARNs non codants comme des niveaux additionnels de la régulation de processus physiologiques et ils sont largement décrits comme dérégulés dans de nombreuses pathologies humaines telles que le cancer, l'infarctus du myocarde ou bien des dystrophies musculaires (Eisenberg et al., 2007; Li et al., 2013; van Schooneveld et al., 2012).

Les miRNAs contrôlent la stabilité et/ou l'efficacité de la traduction des ARN messagers cibles et constituent ainsi des régulateurs post-transcriptionnels (Wienholds and Plasterk, 2005). Les miRNAs sont tout d'abord transcrits en longs transcrits primaires (pri-miRNAs) qui coderont pour un ou plusieurs miRNAs (Cai et al., 2004; Lee et al., 2004). Les pri-miRNAs sont ensuite pris en charge par l'enzyme Drosha qui génère des structures « tige-boucle » de 70 nucléotides (pre-miRNAs) ensuite exportées dans le cytoplasme (Lee et al., 2003). La RNase Dicer permet alors de produire les miRNAs matures d'environ 22 nucléotides qui sont ensuite incorporés au complexe RISC (RNA-induced silencing complex) avant de pouvoir se fixer sur la région 3'UTR du mRNA cible. Le miRNA va, selon sa complémentarité avec sa cible, inhiber la traduction ou bien dégrader l'ARNm (Erriquez et al., 2013; Wienholds and Plasterk, 2005).

De nombreuses études soulèvent un lien entre les microARNs et la biologie du muscle. Ces molécules pourraient notamment avoir un rôle crucial au cours du développement musculaire et dans des pathologies musculaires (Eisenberg et al., 2009).

#### 3.1.2.2 miRNAs musculaires

Les miRNAs ont un rôle important dans le développement du muscle squelettique, en intervenant notamment dans la prolifération et différenciation cellulaire. miR-1, miR-133 et miR-206, largement étudiés, font partis des miRNAs exclusivement exprimés au niveau du muscle et sont nommés myomiRs. Ils sont régulés dans le réseau transcriptionnel musculaire par les MRFs et autres régulateurs clés du programme myogénique tels que MEF2 (myocyte enhancer factor 2) et SRFs (Serum Response factors) (Liu et al., 2007a; Rao et al., 2006) (Figure 16). miR-133 augmente la prolifération des myoblastes tandis que miR-1 et miR-206 favorisent la différenciation musculaire en ciblant notamment Pax7, un facteur de transcription déterminant l'engagement myogénique (Chen et al., 2006, 2010; Goljanek-Whysall et al., 2012; Kim et al., 2006). miR-208b et miR-499 sont également des myomiRs produits à partir d'introns de deux gènes de myosine,  *$\beta$ -MHC* et *Myh7b*. Ils ont un rôle dans la spécification du type de fibre en favorisant plutôt les fibres lentes (van Rooij et al., 2009).

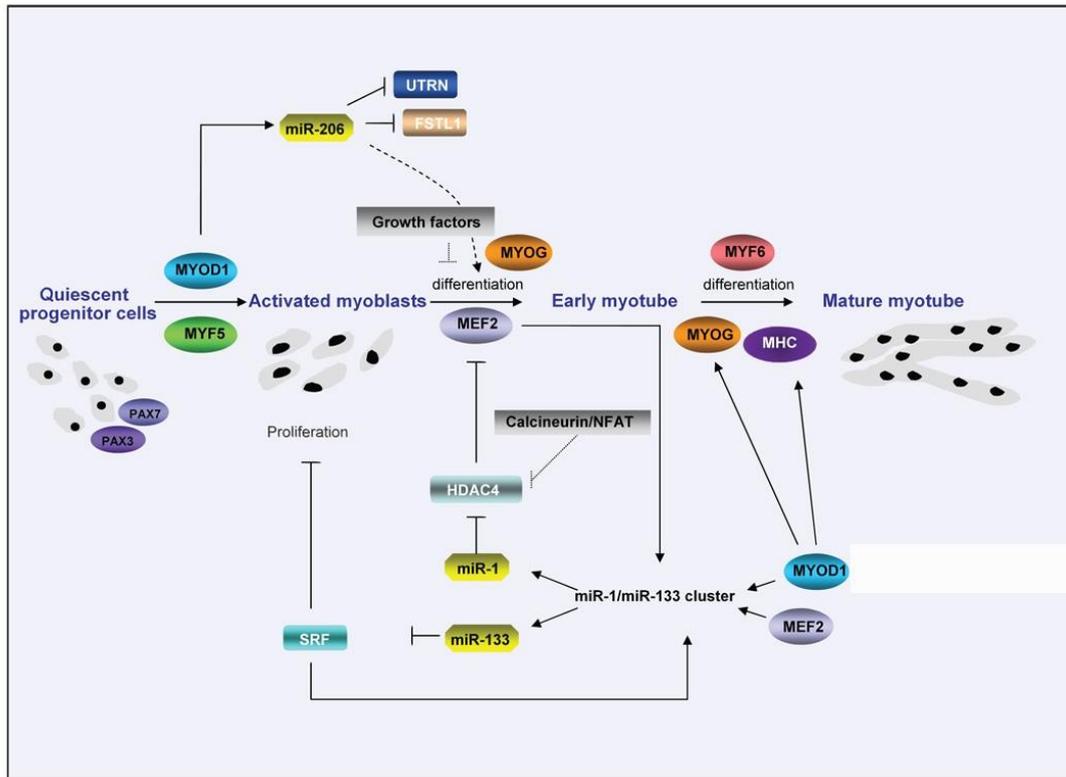


Figure 16 **miRNAs dans le développement musculaire**

miR-1, miR-133, miR-206 agissent au centre du réseau des facteurs de transcription qui régulent la prolifération et différenciation des myoblastes. MEF2 (Myocyte enhancer factor-2) et MyoD1 (myogenic differentiation 1) activent la transcription des clusters bicistroniques miR-1/miR133 qui codent pour les miR-1 et miR-133 dans le muscle squelettique différencié. miR-1 réprime l'expression de HDAC4 (Histone Deacetylase 4), un répresseur de l'activité de MEF2, et favorise ainsi la différenciation des myoblastes. Le niveau de miR-133 augmente au cours de la myogenèse et favorise la prolifération des myoblastes en réprimant SRF (Serum Response Factor). MyoD1 augmente également l'expression de miR-206 qui favorise la différenciation musculaire. (Eisenberg et al., 2009)

Certains miRNAs exprimés de manière ubiquitaire jouent également un rôle dans la régulation du métabolisme musculaire et l'engagement cellulaire. Parmi eux, on relève des miRNAs qui régulent positivement la prolifération au cours de la myogenèse et contiennent ainsi le processus de différenciation comme miR-125b qui contribue à diminuer la différenciation des myoblastes et la régénération musculaire en agissant sur les voies de mTOR et IGF-2 (Ge et al., 2011). miR-221/222, dont l'expression est sous le contrôle de la voie Ras-MAPK, sont quant à eux plutôt impliqués dans le maintien de la prolifération. En ayant pour cible directe l'ARNm de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27, ils permettent la progression du cycle cellulaire (Cardinali et al., 2009). D'autres miRNAs, non spécifiques du muscle, ont une action positive sur la différenciation musculaire comme miR-27b qui contribue à l'entrée dans le programme de différenciation en inhibant Pax3 (Crist et al., 2009) et miR-29 qui inhibe également la prolifération et favorise la différenciation en ciblant Akt3 (Wei et al.,

2013). miR-486, qui est un miRNA enrichi dans le muscle, est connu pour réguler positivement la différenciation des myoblastes en ciblant PTEN (Phosphatase and tensin homolog) et Foxo1, qui inhibent la voie PI3K/Akt et le facteur de transcription Pax7 (Alexander et al., 2011; Dey et al., 2011; Eisenberg et al., 2009).

### 3.1.2.3 miRNAs dans les dystrophies musculaires

De nombreux miRNAs sont retrouvés dérégulés dans le tissu musculaire au cours de pathologies telles que les dystrophies musculaires, les myopathies inflammatoires et les myopathies congénitales. Une étude réalisée par une puce d'expression ciblant 428 miRNAs humains montre que 185 miRNAs sont dérégulés au niveau des muscles dans au moins l'une des dix pathologies musculaires étudiées (Eisenberg et al., 2007). Chez les patients DMD, 39 miRNAs sont retrouvés surexprimés et 23 sont sous-exprimés. Greco *et al.* classent les miRNAs dérégulés au cours de la DMD en trois catégories (Greco et al., 2009). Les miRNAs impliqués dans la régénération (miR-31, miR-34c, miR-206, miR-335, miR-449, miR-494) sont surexprimés tandis que les miRNAs de la dégénérescence (miR-1, miR-29c, miR-135a) sont sous-exprimés chez les patients DMD. Enfin, les miRNAs inflammatoires, miR-222 et miR-223, sont surexprimés chez les patients DMD. L'étude de fibres musculaires isolées d'un modèle ischémique de souris a montré que ces 2 miRNAs sont exprimés dans les zones musculaires endommagées et que leur expression est corrélée à une infiltration par des cellules inflammatoires. Une signature identique a été observée chez la souris *mdx* concernant l'expression de l'ensemble de ces miRNAs (Greco et al., 2009). Chez la souris *mdx*, les miR-1 et miR-133 sont sous-exprimés (Roberts et al., 2012; Yuasa et al., 2008) et il est possible de restaurer leur niveau par une approche de saut d'exon qui permet l'expression d'une protéine dystrophine partielle mais fonctionnelle (Cacchiarelli et al., 2010). Ceci corrobore la corrélation directe entre le niveau d'expression de ces miRs et le taux de dystrophine. Un modèle de la voie reliant la dystrophine et l'expression de miRs a d'ailleurs été proposé (Cacchiarelli et al., 2010) (Figure 17). A l'inverse des myomiRs -1 et -133, le miR-206 montre une expression augmentée dans le muscle *mdx* (McCarthy et al., 2007; Roberts et al., 2012; Yuasa et al., 2008) où il active le programme de différenciation des cellules satellites en réprimant Pax7 et HDAC4 (Cacchiarelli et al., 2010; Liu et al., 2012a; Williams et al., 2009; Winbanks et al., 2013). miR-206 est préférentiellement exprimé dans les fibres en régénération ou bien nouvellement formées (Yuasa et al., 2008).

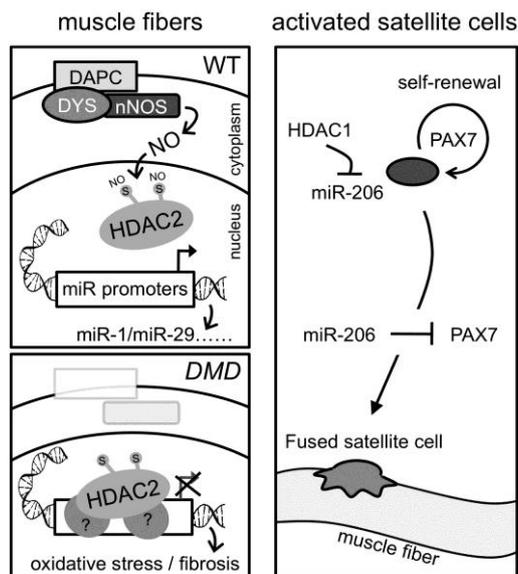


Figure 17 **Modèle reliant la dystrophine à l'expression des miRNAs**

Dans les fibres musculaires "WT", la dystrophine et son complexe DAPC activent nNOS et la S-nitrosylation de HDAC2 (Histone deacetylase 2). HDAC2 est alors relâché de la chromatine ce qui active l'expression de miRs tels que miR-1 et miR-29. Dans un contexte de DMD, l'absence de dystrophine engendre une délocalisation de nNOS et ainsi une moindre nitrosylation de HDAC2 qui reste alors fixé sur les promoteurs des miRs et réprime leur expression. miR-206 qui échappe à ce contrôle est contrôlé par HDAC1 et va réprimer Pax7 pour permettre la différenciation musculaire. (Cacchiarelli et al., 2010)

miR-486, qui module la voie PTEN/PI3K/Akt, est remarquablement diminué dans le muscle de souris *mdx5cv* et dans le muscle de patients DMD (Alexander et al., 2011). PTEN est connu pour être augmenté dans les muscles dystrophiques, ce qui engendre une moindre phosphorylation de Akt (Feron et al., 2009; Haslett et al., 2002). A l'inverse, il a été démontré qu'une surexpression de la forme constitutivement active de Akt permet une amélioration du phénotype tissulaire et de la fonction musculaire de souris *mdx* (Kim et al., 2011). DOCK3 (Dedicator of Cytokinesis 3) a récemment été identifié comme une cible de miR-486 dans le muscle squelettique et il module la voie PTEN/Akt (Alexander et al., 2014). Ainsi, une surexpression de miR-486 chez la souris *mdx*<sup>5cv</sup> diminue les taux de DOCK3, réduit l'expression de PTEN, et par conséquent augmente les taux de phospho-Akt ce qui permet d'améliorer leur fonction musculaire (Alexander et al., 2014).

## 3.2 Biomarqueurs circulants

En 2001, le « National Institute of Health » a proposé de définir un biomarqueur comme étant « une caractéristique qui est objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur de processus biologiques normaux ou pathologiques, ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique ».

Il existe ainsi trois types de biomarqueurs :

- les biomarqueurs diagnostics qui permettent d'identifier un risque ou une prédisposition pathologique et de diagnostiquer une maladie,
- les biomarqueurs pronostics qui permettent de différencier les stades de la maladie et de suivre l'évolution de la pathologie,
- les biomarqueurs de suivi thérapeutique qui peuvent évaluer de façon précoce l'efficacité d'un traitement.

Avant de mettre au point un test de dosage d'un biomarqueur il est requis 1) d'identifier le biomarqueur spécifique de la pathologie ou de l'efficacité du traitement, 2) de valider le biomarqueur identifié sur une cohorte de patients et enfin 3) de développer un test facilement utilisable en clinique et à moindre coût. Un biomarqueur doit être mesuré avec fiabilité et précision et peut être recherché à partir de tissus ou bien à partir de fluides biologiques tels que le sérum et l'urine.

Ces dernières années, des stratégies d'identification de nouveaux biomarqueurs de pathologies ont été développées à partir d'approches génomiques et protéomiques. Ces dernières ont notamment permis d'identifier des biomarqueurs de maladies neuromusculaires (Dowling et al., 2014; Scotton et al., 2014).

### 3.2.1 miRNAs circulants

Les miRNAs sont présents dans la circulation sanguine où ils peuvent y être libérés suite à des lésions tissulaires et notamment des fibres musculaires. Les miR-1, -133 et -206 sont très fortement enrichis (plus de 50 fois) dans le sérum de souris *mdx* et de patients DMD (Cacchiarelli et al., 2011; Mizuno et al., 2011; Roberts et al., 2012; Vignier et al., 2013). Cette importante augmentation d'expression dans le sérum peut difficilement être corrélée à leur expression au niveau tissulaire puisque dans le muscle squelettique l'expression de miR-206 est augmentée mais à des taux moindres (4 à 10 fois) tandis que miR-1 et -133 y sont sous-exprimés. Ainsi, l'augmentation des myomiRs dans le sérum n'est pas liée aux

changements d'expression dans le muscle. Il est supposé que la principale cause de cette augmentation correspond à un relargage par les fibres musculaires endommagées dont l'intégrité du sarcolemme est altérée (Mizuno et al., 2011; Vignier et al., 2013). L'hypothèse d'une sécrétion de miRNAs est également avancée et Roberts *et al.* proposent que les miRNAs sont activement libérés des muscles dystrophiques (Mizuno et al., 2011; Roberts et al., 2012). Les miRNAs circulants peuvent être encapsulés dans des exosomes ou microvésicules (Hunter et al., 2008; Mitchell et al., 2010), cependant, dans la majorité des cas, ils ne sont pas associés à des vésicules mais plutôt présents dans un complexe ribonucléoprotéique tel que celui de Argonaute 2 (Arroyo et al., 2011; Chevillet et al., 2014).

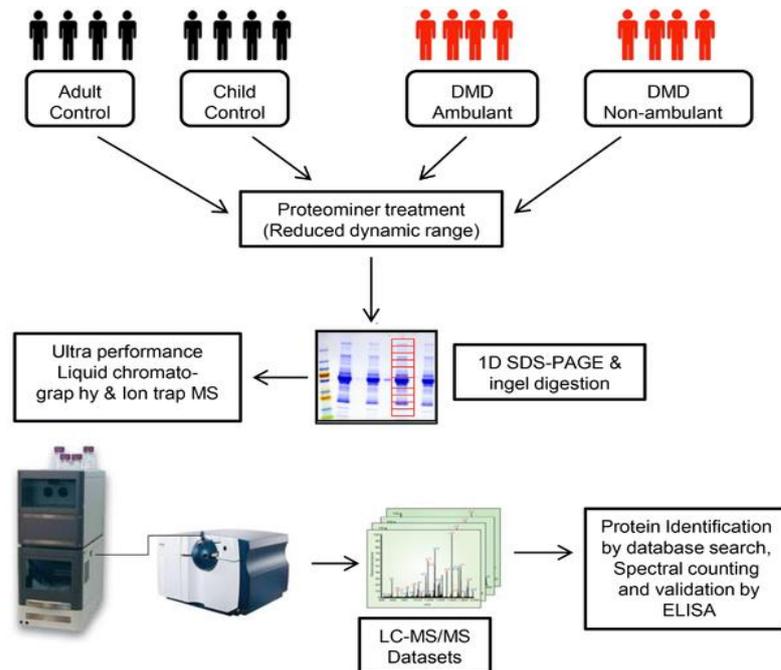
Plusieurs études positionnent des miRNAs comme biomarqueurs de la DMD (Cacchiarelli et al., 2011; Mizuno et al., 2011; Zaharieva et al., 2013). Chez la souris *mdx* et le chien CXMDJ, les niveaux d'expression des miR-1, miR-133 et miR-206 sont augmentés dans le sérum et un intérêt soulevé est qu'ils varient moins que le taux de CK après exercice chez la souris *mdx* (Mizuno et al., 2011). Récemment, une approche de séquençage à haut débit des miRNAs sériques a permis d'identifier de nouveaux biomarqueurs potentiels chez le chien GRMD (Jeanson-Leh et al., 2014). Parmi eux, sont retrouvés des miRNAs associés aux cardiomyopathies (miR-208a, miR-208b, miR-499) dont la dérégulation a été confirmée sur une petite cohorte de patients DMD. Une étude réalisée sur 10 patients DMD ambulants âgés de moins de 6 ans montre que les taux de miRNAs spécifiques du muscle retrouvés dans la circulation sanguine sont inversement proportionnels au score clinique NSAA (North Star Ambulatory Assessment) qui est attribué suite à un test fonctionnel (Cacchiarelli et al., 2011). L'augmentation des myomiRs dans le sérum peut ainsi être corrélée à la sévérité de la pathologie, contrairement au taux de CK qui peut varier suite à différents stress. Cacchiarelli et al. ont également recherché l'effet d'un traitement par thérapie génique sur l'expression des miRNAs sériques dans le modèle de souris *mdx*. Des souris *mdx* ayant reçu un traitement par un saut d'exon 23 utilisant des AAV porteurs de U1-SnRNAs présentent une restauration de la dystrophine et une amélioration de l'intégrité du tissu musculaire. En outre, elles sont capables de restaurer une expression de miR-1 et -206 équivalente à celle des souris contrôles, tandis que cette expression reste 20 à 40 fois supérieure chez les souris *mdx* non traitées. Les auteurs de l'étude proposent ainsi ces miRNAs comme potentiels biomarqueurs pour la thérapie génique de la DMD. Plus récemment, une étude a été réalisée sur une plus grande cohorte constituée de 44 patients DMD ambulants et non-ambulants et n'a cependant pas permis d'établir une corrélation entre les scores NSAA et le taux des dystromirs (miR-1, miR-

206, miR-31, miR-133a, miR-133b) sériques de 26 patients ambulants âgés de 4 à 13 ans (Zaharieva et al., 2013). Il existe en revanche une corrélation positive entre les niveaux de miR-1 et miR-133b et un autre paramètre clinique, la valeur FVC (forced vital capacity). De manière intéressante, le niveau de ces miRs est très élevé chez les jeunes patients puis diminue avec l'âge, ce qui pourrait refléter une perte des fibres musculaires et leur remplacement par du tissu fibreux et adipeux. L'étude de l'expression des miRNAs sériques chez des patients DMD ayant reçu un traitement par thérapie génique, l'eteplirsén, n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative post-traitement, malgré une restauration partielle de l'expression de dystrophine. Les résultats obtenus avec cette cohorte de patients n'a pas permis de statuer sur l'utilisation des miRNAs comme biomarqueurs de stratégies thérapeutiques par exon skipping (Zaharieva et al., 2013).

### **3.2.2 Autres biomarqueurs circulants**

Des biomarqueurs candidats peuvent être identifiés à partir de fluides biologiques par des approches génomiques, transcriptomiques et protéomiques. Actuellement, des méta-analyses de données d'expression génique sont également réalisées pour mettre en lumière des biomarqueurs de la DMD (Kotelnikova et al., 2012). Une deuxième étape consiste en la validation de la pertinence de ces biomarqueurs potentiels sur une plus grande cohorte d'échantillons (Paulovich et al., 2008).

Récemment, une étude par une approche protéomique de sérums de patients DMD ambulants et non-ambulants ainsi que de sujets contrôles a permis d'identifier la fibronectine comme un nouveau biomarqueur sérique de la DMD (Cynthia Martin et al., 2014) (Figure 18).



**Figure 18 Stratégie de recherche de biomarqueurs sériques de la DMD par une approche protéomique**

Des sérums de patients DMD ambulants et non ambulants ainsi que des sérums contrôles ont été soumis à un traitement ProteoMiner permettant de diluer les protéines très abondantes et de concentrer les protéines faiblement abondantes, à une migration sur gel puis à une analyse par spectrométrie de masse (MS). Après identification des protéines et analyse des spectres, les biomarqueurs potentiels identifiés sont validés par un test Elisa. (Cynthia Martin et al., 2014)

L'étude longitudinale portant sur des échantillons d'un même patient DMD pris à différents âges montre une corrélation positive entre le taux de fibronectine circulante et l'évolution de la maladie. Le taux de fibronectine augmente donc avec la progression de la pathologie ce qui en fait un biomarqueur potentiel. La fibronectine est une protéine impliquée dans la fibrose et une étude de l'expression génique de muscles de patients DMD avait déjà montré sa surexpression au niveau tissulaire à des stades précoces de la maladie (Pescatori et al., 2007).

L'ostéopontine (SPP1), la « Tissue Inhibitor of MetalloProteinase » (TIMP-1) et la « Matrix Metalloproteinase-9 » (MMP-9) ont également été proposés comme biomarqueurs potentiels de la DMD (Li et al., 2009; Nadarajah et al., 2011; Vetrone et al., 2009). Ces trois biomarqueurs ont un rôle dans l'inflammation, la fibrose et la dégradation de la MEC qui sont des caractéristiques tissulaires majeures dans l'évolution de la DMD. La concentration de SPP1 est augmentée dans le sérum et le muscle de souris *mdx* (Vetrone et al., 2009). De plus,

il a été démontré que des souris *mdx* KO pour SPP1 ont des taux réduits de neutrophiles et de TGF- $\beta$  ce qui diminue la fibrose. La surexpression de SPP1 a été montrée par différentes études d'expression de muscles de patients DMD (Haslett et al., 2002; Pescatori et al., 2007). Les taux de TIMP-1 et de MMP-9 dans le sérum sont plus élevés chez les patients DMD que chez les sujets contrôles. De plus, les patients plus âgés et non ambulants présentent des taux de MMP-9 beaucoup plus importants que les patients ambulants ce qui suggère que l'augmentation de MMP-9 est corrélée à la progression de la maladie, hypothèse confirmée par l'étude longitudinale.

Une récente étude protéomique, comparant le protéome du sérum de souris *mdx* à celui de souris contrôles, a établi une liste de potentiels biomarqueurs sériques et a confirmé une élévation de 20 d'entre eux dans le sérum de patients DMD (Hathout et al., 2014). Ces biomarqueurs sériques proposés sont essentiellement des enzymes glycolytiques (glycogène phosphorylase, lactate déshydrogénase, fructose-biphosphate aldolase, beta-énolase), des protéines myofibrillaires (myoméline-3, titine, chaîne légère de la myosine) et autres protéines dérivées du muscle (adiponectine, métalloprotéinase matricielle 9, protéine de liaison cardiaque aux acides gras).

Les biomarqueurs potentiels de la DMD sont également recherchés dans les urines, un autre fluide biologique qui présente une composition protéique relativement stable et qui peut être obtenu en grande quantité de manière non-invasive. La comparaison du protéome urinaire de patients DMD à celui de sujets sains par spectrométrie de masse a révélé que, sur 1100 protéines identifiées, 32 sont différentiellement exprimées (Rouillon et al., 2014). De manière intéressante, les résultats montrent des fragments de la protéine Titine dans les urines de patients DMD et BMD lesquels sont en revanche absents chez les sujets sains. Il s'agit ainsi du premier biomarqueur urinaire de dystrophies musculaires.

La revue bibliographique a décrit la physiopathologie de la DMD et ses différents modèles animaux avant d'exposer les différentes stratégies thérapeutiques de la DMD et notamment la thérapie cellulaire qui m'intéresse plus particulièrement dans le cadre de ma thèse. Il est important de considérer qu'il existe une grande variété de cellules souches et progéniteurs capables de s'engager dans le programme myogénique qui sont isolés selon différentes méthodes. A cette diversité s'ajoute la complexité de leur identité. La caractérisation de ces populations cellulaires est nécessaire afin de renseigner leur filiation et de les positionner les unes par rapport aux autres. Le micro-environnement apparaît déterminant pour le destin des cellules souches et son impact est à prendre en considération. La dernière partie de l'introduction a montré l'apport des approches « omiques » dans l'étude des mécanismes physiopathologiques de la DMD mais également dans l'identification de biomarqueurs de la pathologie, qu'ils soient tissulaires ou circulants. Ces stratégies à haut débit sont désormais mises en place dans le but d'identifier des biomarqueurs thérapeutiques, permettant de suivre l'efficacité d'un traitement.

La partie expérimentale qui suit est divisée en deux chapitres. Le premier consiste en l'exploration des conséquences tissulaires de l'apport de cellules MuStem chez le chien GRMD et la recherche de biomarqueurs. Une étude comparée du profil d'expression génique du muscle squelettique de chien GRMD ainsi qu'une étude de l'expression de miRNAs nous permet d'approfondir la physiopathologie du chien GRMD mais également d'investiguer l'impact moléculaire de la thérapie cellulaire MuStem. Le second chapitre participe à la caractérisation des cellules MuStem humaines. Il comprend une étude visant à rechercher la présence de marqueurs primitifs dans les cellules MuStem mais aussi une étude de l'impact du micro-environnement sur les cellules MuStem et plus particulièrement de leur réponse en conditions oxydative et hypoxique.

# Partie expérimentale



# Chapitre 1. Exploration des conséquences tissulaires de l'apport de cellules MuStem et recherche de biomarqueurs

## 1.1 Profil moléculaire du muscle squelettique de chien GRMD après administration systémique de cellules MuStem

### 1.1.1 Positionnement

L'UMR 703 PAnTher développe, depuis plusieurs années, une exploration des cellules dérivées du muscle (Jouvion et al., 2006; Rouger et al., 2004) et plus particulièrement de celles présentant un déficit initial d'adhérence (Rouger et al., 2007). Elle a ainsi isolé des cellules nommées MuStem à partir de muscle squelettique de chien sain sur la base d'une adaptation du protocole de préplating initialement décrit chez la souris (Qu, 1998; Qu-Petersen et al., 2002). Ce protocole consiste en une succession de transferts de surnageant de culture et permet d'isoler une fraction marginale de cellules à adhérence tardive. Les cellules ainsi isolées chez la souris, nommées MDSC, présentent une forte capacité proliférative et permettent une réexpression de la dystrophine ainsi qu'une régénération musculaire efficace après transplantation chez la souris *mdx* (Qu-Petersen et al., 2002). Les cellules MuStem canines isolées au sein de l'UMR montrent une grande capacité d'expansion *in vitro* associée à une forte clonogénicité et peuvent proliférer en suspension sous forme de myosphères ou générer sur support plastique une population hétérogène de cellules fusiformes et rondes. Phénotypiquement, les cellules MuStem correspondent à des progéniteurs engagés dans le programme myogénique mais sont toutefois capables de se différencier en cellules adipogéniques et ostéogéniques, ce qui atteste de leur oligopotence. Les cellules MuStem ont montré la preuve de leur efficacité thérapeutique chez le chien GRMD puisque leur injection systémique induit une limitation des dommages musculaires, une augmentation de la régénération et une stabilisation persistante de l'état clinique des chiens (Rouger et al., 2011). Les cellules MuStem se positionnent ainsi comme des candidates potentielles à la thérapie cellulaire de la DMD.

Il est important de souligner que ces résultats pré-cliniques ont été obtenus dans un contexte de faible expression de dystrophine au niveau des fibres musculaires. Ces données

laissent suggérer que la faible restauration de dystrophine ne peut à elle seule expliquer l'effet général des cellules MuStem et que d'autres mécanismes moléculaires sont impliqués.

Dans ce contexte, une partie de mon travail de thèse a consisté à m'interroger sur les mécanismes d'action potentiels des cellules MuStem en étudiant notamment les conséquences moléculaires du traitement par thérapie cellulaire MuStem dans le muscle dystrophique canin. Pour cela, j'ai mis en place une étude transcriptomique permettant de comparer sans a priori le profil d'expression génique de muscles de chiens sains, GRMD et GRMD traités, quatre mois après la transplantation allogénique de cellules MuStem. Par cette démarche expérimentale reposant sur l'utilisation d'une puce Agilent, nous avons cherché à analyser simultanément un grand nombre de processus biologiques dans le but de pouvoir détecter des changements globaux intervenant dans ce tissu hautement remanié. Les transcrits identifiés, modifiés suite au traitement MuStem, pourront être validés comme des cibles qui seront ensuite abordées avec des approches plus classiques d'histologie, de biologie moléculaire ou de biochimie.

## 1.1.2 Matériel et méthodes

### 1.1.2.1 Animaux

Un ensemble de 17 chiens Golden Retriever a été requis pour la réalisation de cette étude. Parmi eux, 7 chiens sains ont permis de réaliser les extractions de cellules MuStem et 3 autres ont été dédiés aux investigations moléculaires et protéiques. Sept chiens GRMD ont été inclus dans cette étude et quatre d'entre eux ont reçu des injections de cellules MuStem, nommés par la suite chiens GRMD<sup>MuStem</sup>. Les chiens ont fait l'objet d'un suivi clinique hebdomadaire et un score clinique leur a été attribué. Les chiens ont été euthanasiés à l'âge de neuf mois à l'exception de deux chiens GRMD, dont un chien GRMD<sup>MuStem</sup>, morts spontanément de broncho-pneumonie avant la fin du protocole et un autre chien GRMD<sup>MuStem</sup> maintenu en vie pour un suivi à plus long terme. Ainsi, 2 chiens sains, 2 chiens GRMD et 2 chiens GRMD<sup>MuStem</sup> ont été inclus dans la réalisation de la puce d'expression génique.

### 1.1.2.2 Traitement immunosuppresseur

Les chiens GRMD ont été immunosupprimés avec un traitement combinant de la cyclosporine A, qui bloque la calcineurine et la cascade d'activation lymphocytaire, et de l'azathioprine qui bloque la synthèse des nucléotides puriques et empêche la prolifération des

lymphocytes et des cellules NK. Pour les chiens GRMD<sup>MuStem</sup>, le traitement immunosuppresseur a commencé une semaine avant l'administration des cellules, correspondant à un âge de 14-16 semaines, et a été maintenu tout au long du protocole. Les chiens GRMD mock, non injectés, ont reçu le même traitement immunosuppresseur.

#### 1.1.2.3 Préparation des échantillons d'ARN totaux déposés sur puce

J'ai pris en charge la préparation et le contrôle qualité des échantillons d'ARN totaux qui ont ensuite été confiés à la plateforme génomique intégrative de Nantes pour la réalisation des expériences de la puce à ADN à proprement parlé.

Les ARN totaux ont été extraits à partir d'environ 50 mg de muscle *Biceps femoris*. Nous avons fait le choix de réaliser deux extractions indépendantes du même muscle, à partir de deux prélèvements différents pour être plus représentatif du muscle et non d'une zone spécifique. Les échantillons d'ARNs, constitués des deux extractions en quantité égale, ont ensuite été traités à la DNase afin de s'assurer qu'il ne reste plus d'ADN génomique. La qualité des ARNs a été vérifiée par une puce « Agilent Eukaryote Total RNA Nano » (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Un électrophérogramme des échantillons a été établi et a permis de vérifier l'absence de produit de dégradation. Cette technique a aussi permis d'apprécier l'intégrité des ARNs totaux par le calcul d'un RIN (RNA Integrity Number). Un RIN supérieur à 6,5 constitue un critère essentiel de validation des échantillons déposés sur la puce à ADN et un gage de qualité des données générées par la suite. Tous nos échantillons ont présentés des valeurs de RIN comprises entre 8 et 10 et ont ainsi été validés.

#### 1.1.2.4 Hybridation sur la puce canine d'expression génique

La puce canine Agilent utilisée contient 43603 sondes permettant de mesurer de façon simultanée l'expression de 13817 gènes. Sur la plateforme génomique intégrative de Nantes, les ARNs ont été amplifiés, marqués puis hybridés deux à deux sur la puce Agilent. La puce a été scannée puis les données brutes d'intensité de fluorescence ont été extraites avec l'aide du logiciel Agilent « Feature Extraction ».

#### 1.1.2.5 Analyse des données d'expression

J'ai eu l'opportunité de suivre une formation qualifiante « Analyse de données de puces à ADN » proposée par la plateforme bio-informatique de l'Université de Nantes qui m'a permis de comprendre le traitement des données brutes et de participer aux décisions de la stratégie d'analyse. L'analyse des données brutes d'expression a été réalisée par une bio-

informaticienne en post-doctorat du laboratoire, Aurélie Lardenois. Après la normalisation des données, une filtration statistique et une classification ont été réalisées pour chaque comparaison: chiens GRMD *versus* Sains, GRMD<sup>MuStem</sup> *versus* Sains et GRMD<sup>MuStem</sup> *versus* GRMD. Les sondes avec un signal supérieur au bruit de fond, correspondant à la médiane des données d'expression normalisées, ont été identifiées et les sondes avec un FC (Fold Change) supérieur à 2, dans l'une ou l'autre des comparaisons, ont été retenues pour l'analyse correspondant à un total de 1074 sondes. Un test statistique de LIMMA a permis d'identifier 608 sondes différentiellement exprimées de façon significative réparties en 430, 567 et 41 sondes pour les 3 comparaisons. Ces 608 sondes correspondent en réalité à 457 gènes, et 282 gènes différentiellement exprimés pour la comparaison GRMD *versus* Sains, 384 pour la comparaison GRMD<sup>MuStem</sup> *versus* Sains et 31 pour la comparaison GRMD<sup>MuStem</sup> *versus* GRMD ont été identifiés. Une ré-annotation des sondes a également été réalisée en confrontant plusieurs bases de données. Une analyse d'enrichissement en termes GO (Gene Ontology) a permis de dégager des termes enrichis concernant des processus biologiques ou fonctions biologiques.

#### 1.1.2.6 Validations par RT-qPCR

J'ai pu valider les données de la puce à ADN en analysant par une autre technique l'expression de 15 gènes parmi les 31 gènes différentiellement exprimés entre les chiens GRMD et GRMD<sup>MuStem</sup>. Nous avons sélectionné des gènes présentant des profils d'expression différents, surexprimés ou sous-exprimés chez les chiens GRMD<sup>MuStem</sup> par rapport aux chiens GRMD et revenant ou non au niveau d'expression du chien sain. Des RT-qPCR ont donc été réalisées pour les 15 gènes à partir des mêmes échantillons utilisés pour la puce à ADN et les niveaux d'expression relative ont été calculés par la méthode des  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

#### 1.1.3 Résumé des résultats obtenus

Dans cette étude, nous établissons pour la première fois le profil transcriptomique de muscle squelettique de chiens GRMD et nous montrons une modification d'expression de 282 gènes par rapport au muscle de chien sain. Parmi eux, les gènes sur-exprimés sont notamment associés à la régénération, la réponse inflammatoire, l'organisation de la MEC, la liaison au calcium et l'adhésion cellulaire. Les gènes sous-exprimés sont retrouvés particulièrement représentés dans les processus métaboliques. Les résultats obtenus sont corrélés avec ceux décrits par ailleurs chez les patients DMD puisque, parmi les 282 gènes différentiellement exprimés chez les chiens GRMD, 117 ont également été décrits comme étant dérégulés chez

les patients DMD et 98% d'entre eux présentent une dérégulation dans le même sens (Chen et al., 2000; Haslett et al., 2003, 2002; Pescatori et al., 2007).

De manière importante, 31 gènes sont retrouvés différenciellement exprimés entre les chiens GRMD et GRMD<sup>MuStem</sup>, reflétant l'impact de la thérapie cellulaire MuStem sur le profil moléculaire de ces chiens. Seize gènes sont significativement surexprimés dans le muscle des chiens GRMD<sup>MuStem</sup> et 15 sont sous-exprimés. Parmi les 31 gènes, 8 présentent une diminution d'expression chez les chiens GRMD par rapport aux chiens sains qui est remarquablement accentuée chez les chiens GRMD<sup>MuStem</sup>. A l'inverse, certains gènes qui sont surexprimés chez les chiens GRMD par rapport aux chiens sains se retrouvent sous-exprimés chez les chiens GRMD<sup>MuStem</sup> pour revenir à un niveau d'expression équivalent à celui des chiens sains voir inférieur.

La recherche de termes GO associés à ces gènes différenciellement exprimés chez les chiens GRMD<sup>MuStem</sup> montre un impact moléculaire de la thérapie cellulaire MuStem sur divers processus biologiques tels que la régénération musculaire, l'homéostasie cellulaire et le métabolisme. Plus particulièrement, l'administration systémique de cellules MuStem modifie l'expression de gènes impliqués dans l'activation des cellules satellites tels que MUSTN1 et dans la régénération musculaire comme SPP1, MYH3/8, DEPTOR. Elle modifie également l'expression de gènes impliqués dans les voies de dégradation et du contrôle qualité des protéines (FBXO32, TRIM63, ZFAND5, MT2A) et dans la voie anti-apoptotique (MCL1, AMIGO2). Des gènes jouant un rôle dans le métabolisme lipidique (ST3GAL5, GPD1), glucidique (PP1R3B, PVALB) ou bien encore dans la voie de la créatine kinase (GATM) sont également dérégulés après traitement.

La thérapie cellulaire MuStem a montré son efficacité par la stabilisation de l'état clinique des chiens GRMD traités et des études histologiques ont montré une expression diffuse de dystrophine dans les muscles ainsi qu'un remodelage tissulaire incluant une augmentation de la capacité régénérative. Nous montrons par cette étude que les cellules MuStem ont un impact moléculaire plus global et agissent sur différents processus biologiques.

#### 1.1.4 Article

L'ensemble de ce travail fait l'objet d'un manuscrit actuellement soumis dans le journal « PLoS One » (numéro d'identification du manuscrit : PONE-D-14-40691).



Differential gene expression profiling of dystrophic dog muscle  
after MuStem cell transplantation

Florence Robriquet<sup>1,2,3¶</sup>, Aurélie Lardenois,<sup>1,2¶</sup> Candice Babarit,<sup>1,2</sup> Thibaut Larcher,<sup>1,2</sup>  
Laurence Dubreil,<sup>1,2</sup> Isabelle Leroux,<sup>1,2</sup> Céline Zuber,<sup>1,2</sup> Mireille Ledevin,<sup>1,2</sup> Jack-Yves  
Deschamps,<sup>1,2</sup> Yves Fromes,<sup>2,4</sup> Yan Chérel,<sup>1,2</sup> Laëtitia Guével,<sup>1,2,3&, \*</sup> and Karl Rouger<sup>1,2&</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR703 PAnTher, Nantes, France

<sup>2</sup> LUNAM Université, Oniris, École nationale vétérinaire, agro-alimentaire et de  
l'alimentation Nantes-Atlantique, Nantes, France

<sup>3</sup> Université de Nantes, France

<sup>4</sup> Laboratoire RMN AIM-CEA, Institut de Myologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France

\* Corresponding author

E-mail : laetitia.guevel@univ-nantes.fr (LG)

¶ These authors contributed equally to this work.

& KR and LG are Joint Senior Authors.

**Short title:** Muscle profiling of MuStem cell treated GRMD dog

**Microarray data:**

A data access account is available for reviewers on Array Express. The reviewer account  
details are as follows:

Username: Reviewer\_E-MTAB-2095

Password: agtz7wH1

# Abstract

**Background:** Several adult stem cell populations exhibit myogenic regenerative potential, thus representing attractive candidates for therapeutic approaches of neuromuscular diseases such as Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). We have recently shown that systemic delivery of MuStem cells, skeletal muscle-resident stem cells isolated in healthy dog, generates the remodelling of muscle tissue and gives rise to striking clinical benefit in Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dog. This global effect, which is observed in the clinically relevant DMD animal model, leads us to question here the molecular pathways that are impacted by MuStem cell transplantation. To address this issue, we compare the global gene expression profile between healthy, GRMD and treated GRMD dog muscle, four months after allogenic MuStem cell transplantation.

**Results:** In the dystrophic context of the GRMD dog, disease-related deregulation is observed in the case of 282 genes related to various processes such as inflammatory response, regeneration, calcium ion binding, extracellular matrix organization, metabolism and apoptosis regulation. Importantly, we reveal the impact of MuStem cell transplantation on several molecular and cellular pathways based on a selection of 31 genes displaying signals specifically modulated by the treatment. Concomitant with a diffuse dystrophin expression, a histological remodelling and a stabilization of GRMD dog clinical status, we show that cell delivery is associated with an up-regulation of genes reflecting a sustained enhancement of muscle regeneration. We also identify a decreased mRNA expression of a set of genes having metabolic functions associated with lipid homeostasis and energy. Interestingly, ubiquitin-mediated protein degradation is highly enhanced in GRMD dog muscle after systemic delivery of MuStem cells.

**Conclusions:** Overall, our results provide the first high-throughput characterization of GRMD dog muscle and throw new light on the complex molecular/cellular effects associated with muscle repair and the clinical efficacy of MuStem cell-based therapy.

## Keywords:

Muscle stem cell - Duchenne muscular dystrophy - GRMD model - Transcriptome - Microarray - Cell therapy

## Introduction

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a progressive and fatal X-linked recessive disorder of skeletal and cardiac muscles. It is the most common muscular dystrophy, affecting one in 3,500 male births [1], being characterized by a lack of dystrophin at the muscle fibre membrane [2,3]. Dystrophin is the essential link between the subsarcolemmal cytoskeleton and the extracellular matrix [4,5]. In dystrophin-deficient muscle, this connection is weakened and results in the partial disruption of sarcolemma exposed to high tension and an influx of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  that activates proteases. This leads to successive necrosis/regeneration cycles of the muscle fibres, so that, ultimately, necrotic fibres fail to regenerate and the muscle tissue is progressively replaced by connective and adipose tissue. Numerous observations suggest that the impaired structural role of the dystrophin-glycoprotein complex alone may be insufficient to account for the massive degenerative process and that the deregulation of intracellular signalling pathways concomitant with skeletal muscle tissue remodeling also participate in DMD pathogenesis.

Based on large-scale gene expression analysis, previous studies have described transcriptional changes in the skeletal muscle of individuals with DMD. The first study revealed an over-expression of developmentally regulated genes such as  $\alpha$ -cardiac actin and a down-regulation of nuclear-encoded mitochondrial gene expression [6]. Another study suggested an up-regulation of insulin-like growth factors and the induction of ‘cardiac associated’ genes in dystrophin-deficient muscle due to factors implicated in macrophage infiltration, activation of muscle satellite cells and non-regeneration-linked changes in myofibre homeostasis [7]. It is also well known that immune response signals and extracellular matrix genes, as well as genes encoding muscle structure and regeneration processes, are over-expressed in DMD muscle, thus reflecting the regenerative nature of the disease [8,9]. In a more recent study, Pescatori et al. (2007) described the gene expression signature that characterizes DMD muscle during the initial or presymptomatic phase of the disease, and showed the altered expression of genes involved in the inflammatory response, remodelling of the extracellular matrix, muscle regeneration and energy metabolism. Similar studies have been performed on the *mdx* mouse, a genetic and biochemical model of the human disease [11–14], confirming the presence of many alterations in the dystrophic gene expression profile. Marotta et al. (2009) showed a strong up-regulation of inflammation-related genes as well as genes related to cell adhesion, muscle structure/regeneration and extracellular matrix remodeling during

*mdx* disease evolution. More recently, a transcriptomic study has been performed using a dystrophic dog model, CXMD<sub>J</sub>, to analyse dystrophic diaphragm tissue in the neonatal period [16]. Microarrays have also been described as a useful tool to assess the effects of therapeutic approaches such as the antisense treatment, or the overexpression of utrophin in *mdx* mouse [17,18]. To investigate potential therapies for individuals with DMD, preclinical studies are commonly performed using the Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dog model, which is characterized by rapid progressive clinical dysfunction and severe muscle tissue remodelling [19,20]. GRMD dogs present typical histological features of a dystrophic process with repeated cycles of muscle necrosis and regeneration, variability in fiber size, splitting and fibrosis [21]. Moreover, GRMD dogs show most of the signs found in the human disease, among them muscle wasting, postural abnormalities and premature death, allowing to consider GRMD dog as a relevant animal model for DMD [20–23]. Recently, proteomic profiling performed on GRMD dogs have identified signalling proteins implicated in secondary changes taking place in dystrophic muscles [24,25]. A quantitative proteomic analysis, performed on both cytoplasmic and phospho-enriched fractions, has identified 84 proteins as being differentially represented in GRMD *versus* healthy dog muscle implicated in muscle development and contraction, glycolytic and oxidative metabolism, calcium ion homeostasis, intracellular signalling and regulation of apoptosis [25]. Nevertheless, little is known at present about transcriptional alterations affecting molecular pathways in GRMD dogs. Indeed, only a single transcriptomic study has been carried out with GRMD dogs aiming to define the molecular signals that drive muscle hypertrophy in *Sartorius cranialis* muscle and the differential muscle involvement in the GRMD model [26]. Recently, we have shown that systemic delivery of MuStem cells, isolated using a modification of the procedure that led to the identification of Muscle-Derived Stem Cells [27], could represent an attractive avenue for future therapeutic applications in individuals with DMD. Indeed, when intra-arterially delivered in immunosuppressed GRMD dog, allogeneic MuStem cells contributed to muscle damage course limitation with an increased regeneration activity and an interstitial expansion restriction. Importantly, they allow persisting stabilization of dog's clinical status defined by a clinical score maintained up to 70% of that of the healthy dogs more than 6 months after the cell transplantation, reflecting a poor fatigability, a low intensity of limb stiffness and ankylosis [28]. These effects are linked to a relative low dystrophin protein level and a low percentage of dystrophin-positive muscle fibres that clearly evoke the implication of other molecular mechanisms to explain the mode of action of the MuStem cells. Since

expression profiling allows the simultaneous monitoring of a large number of biological processes, in the present study we used an undedicated transcriptional approach with gene-expression microarrays to analyse muscle samples from healthy, mock GRMD and MuStem cell-treated GRMD dogs (GRMD<sup>MuStem</sup>). This strategy is reinforced by the fact that such an approach can detect changes that are not histologically visible. We provide the first high-throughput characterization of the GRMD dog model and report insights into the molecular/cellular impact of MuStem cell delivery in a dystrophic context. Overall, we show that one remarkable outcome of MuStem cell delivery concerns the up-regulation of genes implicated in regeneration of muscle fibre correlated with histological remodelling. In addition, we find that these cells can act on several other biological pathways implicated in protein degradation mechanisms and energy metabolism.

## Materials and Methods

### *Animals*

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Pays de la Loire Region, France, in accordance with the guidelines from the French National Research Council for the Care and Use of Laboratory Animals (Permit Numbers: CEEA.2012.104). Pain evaluation was performed every day during a complete clinical evaluation by a veterinarian and an analgesia treatment was set up if necessary. Seventeen golden retrievers were included in the study. All the dogs were obtained from the Centre d'Elevage du Domaine des Souches (CEDS, Mézilles, France) and housed in the Boisbonne Centre for Gene and Cell Therapy of Oniris (Nantes, France). The dogs were housed in a controlled environment (temperature  $21 \pm 1$  °C, 12-h light/dark cycle). Affected dogs were identified in the first week of life thanks to polymerase chain reaction (PCR)-based genotyping. This identification was confirmed by a dramatic and early rise in levels of serum creatine kinase [29]. Seven 10-week-old healthy dogs were dedicated to MuStem cell isolation. The 10 other 9-month-old dogs were used in the *in vivo* experiments (3 healthy, 3 GRMD and 4 GRMD<sup>MuStem</sup> dogs) as described in Table 1. All dogs were sacrificed by intravenous administration of sodium pentobarbital (2000 mg, Dolethal, Vetoquinol SA, Magny Vernois).

### ***Canine MuStem cell isolation***

Primary wild type MuStem cells, corresponding to delayed adherent stem cells, were isolated from a pool of hind limb muscles of 10-week-old dogs (n=7; independent experiment) based on a preplating technique, as previously established [28]. Cells were incubated at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>, maintained at roughly 75% of confluence to avoid spontaneous myogenic differentiation and passaged every 4 to 5 days. The medium was replaced every two days to allow for their expansion. MuStem cells correspond to early myogenic progenitors and uncommitted cells characterized by a large expansion capacity and an ability to differentiate into myogenic, osteogenic and adipogenic cells after *in vitro* cell lineage-specific induction.

### ***Immunosuppressive treatment***

GRMD dogs were immunosuppressed with 27 mg/kg of oral cyclosporin (Neoral®; Novartis, Rueil-Malmaison, France) administered daily, in combination with 2.5 mg/kg azathioprine administered on alternate days (Imurel®; Glaxo-Wellcome, Paris, France). A maximum of 10 mg/kg of ketoconazole (Nizoral®; Janssen-Cilag, Issy-les-Moulineaux, France) was also added daily to decrease cyclosporin catabolism. Blood levels of cyclosporin were checked twice a week and maintained at between 250 and 350 ng/mL. The immunosuppressive regimen was started 1 week before the first cell administration, which corresponded to an age ranging from 14 to 16 weeks, and maintained afterwards. Mock GRMD dogs received the same immunosuppressive regimen.

### ***Systemic delivery procedure***

MuStem cell suspensions were prepared with a density range of 12 to 18x10<sup>6</sup> cells/mL in 0.9 % NaCl / 2.5 % homologous serum / 10 U/mL heparin. Three injections of 6.5 to 23x10<sup>7</sup> MuStem cells/kg, corresponding to two bilateral intra-arterial femoral injections and one injection into the cardiac left ventricle, were performed on 4 GRMD dogs aged initially from 15 to 17 weeks, using laminar flow at a rate of 15 mL/min, as previously described [28]. To carry out the intra-cardiac injection, a 5-French angiographic catheter (100 cm long; Launcher coronary guide catheter, Medtronic, Tolochenaz, Switzerland) was advanced in a retrograde manner through the right carotid artery to the left ventricle. The effective crossing of the

aortic valve with the catheter was assessed by appearance of a typical ventricular pressure curve.

### ***Muscle sampling***

*Biceps femoris* muscle samples (0.5 cm<sup>3</sup> fragments) were collected surgically from the middle portion of the muscle in 9-month-old healthy, mock GRMD dogs, and GRMD<sup>MuStem</sup> dogs. This time point corresponds to four months after systemic administration of cells in GRMD<sup>MuStem</sup> dogs. Muscle fragments were divided into two parts for histological and molecular analyses, and subsequently archived at -80 °C until processing.

### ***Histology and immunohistochemistry***

Transverse 8 µm-thick cryostat sections were stained with hematoxylin-eosin-saffron for histopathological assessment. Sections were incubated (overnight, 4 °C) with primary antibody against dystrophin (1:50; NCL-DYS2, Novocastra) or the developmental isoform of myosin heavy chain (MyHCd, 1:100; Novocastra). 488 Alexa fluor conjugated goat anti-mouse IgG (1:300; Invitrogen) (1 h, room temperature (RT)) was used as a secondary antibody against dystrophin. Immunofluorescent labelling was observed with a laser scanning confocal microscope (Nikon C1; Champigny, France), and all acquisitions were performed as previously described [28]. For MyHCd, the sections were incubated with biotinylated goat anti-mouse (1:300; Dako) (1 h, RT) and streptavidin horseradish peroxidase (15 min, RT), which was revealed using DAB (3,3'-Diaminobenzidine) chromogen (10 min, RT). The sections were counterstained with a DRAQ5 dye (Biostatus, Leicestershire, UK) to stain the nuclei. Histomorphometric analyses, including measurements of fibre diameter and number of MyHCd positive fibres, were performed as previously described [28]. Mean fiber diameters were compared among different dog groups with analysis of variance followed by Fisher PLSD tests. Percentages of MyHC<sup>+</sup> fibers were compared between GRMD<sup>MuStem</sup> and mock GRMD dogs using a Mann-Whitney test with a two-tailed P value. A value of P<0.05 was considered to be statistically significant.

### ***Clinical follow-up***

The clinical status of mock GRMD and GRMD<sup>MuStem</sup> dogs was assessed weekly. A clinical score was measured following a previously described method [28,30]. Briefly, the clinical score was established based on 11 locomotion and muscular criteria and 6 items related to the general health status. It was expressed as the percentage of the maximum score defined as 100% for a healthy dog. Reiterated measures ANOVA were carried out from 10 to 39 weeks of age. Among the seven dogs included, four were sacrificed at the end of the protocol corresponding to ages of 40 to 45 weeks, and one dog was maintained for a long-term follow-up. Two dogs died before the end of the protocol at 37 and 38 weeks and displayed severe lesions of aspiration pneumonia after necropsy examination.

### ***RNA isolation***

Total RNA was extracted from about 50 mg of frozen *Biceps femoris* muscle using the RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was quantified using NanoDrop spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Each sample was made by pooling two independent extractions of the same muscle and was treated with DNase Ambion (Life technologies, CA, USA). RNA quality was assessed using the Agilent Eukaryote Total RNA Nano kit with the 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

### ***Canine gene expression microarray hybridization***

The transcriptome experiment was performed by an Integrative Genomic Platform (Nantes, France). mRNA expression profiling was obtained using the Agilent-021193 Canine (V2) Gene Expression Microarray (Grid name: 021193\_D\_F\_20120509- Protocol name: GE2\_107\_Sep09). Microarray hybridizations were performed using standard operating procedures and quality controls (Protocol: G4140-90050\_GeneExpression\_Two\_Color\_v6.5-mai 2010). The labelling and staining were performed according to the Agilent protocol. Briefly, 100 ng of RNA were amplified and stained with cyanine -5 or cyanine-3 dyes (4 RNA with both cyanine cy5 and cy3). Pairs of differentially labelled samples (2x825 ng) were hybridized on a slide in 100 µL of hybridization buffer. After washing, the slides were

scanned by the Agilent Scanner (Agilent Technologies Scanner G2505C). Agilent Feature Extraction software (V 10.7.1.1) was used to analyse the acquired array images.

### ***Raw data preprocessing***

The microarray expression data were pre-processed and analysed using the AMEN (Annotation, Mapping, Expression and Network) suite of tools [31]. The data quality was checked against QC reports from Feature Number Version 10.7.1.1. A background correction was performed on the array data using the “normexp” method [32]. The microarray data quality was verified by plotting the  $\log_2$  signal distribution across samples. The median expression values are considered for redundant probes. The array data of replicate were then normalized using the “quantile-quantile” method. Replicate intensity values of healthy, mock GRMD and GRMD<sup>MuStem</sup> samples were averaged.

### ***Expression data analysis***

Statistical filtration and classification were performed for each pairwise comparison of the samples: mock GRMD *versus* healthy dogs, GRMD<sup>MuStem</sup> *versus* healthy dogs and GRMD<sup>MuStem</sup> *versus* mock GRMD dogs. The detectable probes (22783/22841/22457), yielding signals  $\geq 7.32$  (median of the normalized expression dataset) were first identified in each of the three respective comparisons. A total of 1074 (605/940/99) probes were further selected displaying a high expression variation (fold-change, FC  $\geq 2.0$ ). A LIMMA statistical test [33] was then performed to identify 608 (430/567/41) probes that were significantly differentially expressed (F-value adjusted with the False Discovery Rate,  $p \leq 0.05$ ). For each of the three comparisons, the selected probes were finally classified into two groups (based on the fold-change), named “up” or “down” according to their expression profiles.

### ***Canine gene and probe annotation***

To obtain the most complete annotation possible, we considered the dog annotation based on the Entrez Gene IDs (NCBI) provided in the AMEN suite of tools [31], and then supplemented with the Ensembl annotation. The microarray probes were subsequently mapped on the canFam3 genome using the blat program [34]. To filter the alignments, we considered a percentage of identity of  $\geq 90\%$  over the whole size of the probes (60 bps). The

probes were further associated with canine genes based on their genome coordinates and the overlap with exonic regions of annotated loci. It is noteworthy that a given probe can be assigned to several genes, while several probes can be associated with a single gene.

### ***Gene Ontology enrichment analysis***

The enrichments of annotation terms within a group of genes were calculated using the Fisher exact probability using a Gaussian Hypergeometric test. A Gene Ontology (GO) term is considered to be significantly enriched when the number of genes bearing this annotation is  $\geq 3$  and when the associated FDR-corrected p-value is  $\leq 0.005$  for biological process terms and  $\leq 0.01$  for terms related to the biological function and cellular component categories.

### ***Microarray data repository***

Raw data CEL files are available via the EBI's Array Express database ([www.ebi.ac.uk/arrayexpress](http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress)) under accession number E-MTAB-2095 [35].

### ***Comparison with transcriptomic studies of individuals with DMD***

The group of genes significantly deregulated in muscle of individuals with DMD was extracted from four studies [6,8–10]. The conversion of the Affymetrix human probe set identifiers into dog NCBI Entrez Gene identifiers was performed with the AMEN suite of tools via the HomoloGene database [36] and the array annotations provided by the AILUN annotation platform [37]. A group of human genes is taken as significantly associated with a group of dog genes if the associated p-value is  $\leq 0.005$  (Hypergeometric test).

### ***Quantitative RT-PCR for validating Agilent dataset***

A subset of genes was examined by RT-qPCR to validate the data obtained by microarray analysis. Reverse transcription reactions were carried out on 0.5  $\mu\text{g}$  of total RNA using the GoScript reverse transcriptase (Promega, Madison, USA) in a total volume of 20  $\mu\text{L}$ . All cDNA amplifications were performed, in duplicate or triplicate, using 1/20<sup>th</sup> of the reverse transcription products and the MESA BLUE qPCR kit (Eurogentec, Seraing, Belgium). Quantitative PCR was run on the Thermocycler CFX96 (Biorad, California, USA) with the

following parameters: 5 min at 95 °C for the initial denaturation step, then 15 sec at 95 °C, 1 min at 60 °C per cycle, for a total of 40 cycles. The specific amplification was checked using a melting curve. Gene-specific oligonucleotide primers were designed using Oligo Primer Analysis Software v.7 (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, USA) and synthesized by Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). The primers used are listed in Table 2. RPS18 was selected as an endogenous control. The relative expression levels were calculated by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method.

## Results

### *Clinical follow-up of GRMD dogs*

Our previous results demonstrated the capacity of wild-type MuStem cells to reach muscle tissue and generate clinical benefit following repeated injections into the left femoral artery of GRMD dogs. Here, we reproduce the cell delivery protocol using a 6.5- to 23-fold increase in cell number and performing two bilateral intra-arterial femoral injections combined with an injection in the cardiac left ventricle of four immunosuppressed GRMD dogs. Mock dogs display a progressive clinical impairment as assessed by their clinical score (mock GRMD dogs; #4G to #6G) (Figure 1A). After a dramatic decrease of their ambulatory abilities from 14 to 20 weeks of age, their clinical score stabilizes at 30 to 70 % of the value measured in a healthy dog, illustrating the great variability in their clinical course as previously described [38]. All GRMD dogs that received MuStem cells (GRMD<sup>MuStem</sup> dogs; #7G<sup>Mu</sup> to #10G<sup>Mu</sup>) display an early and persistent stabilization of their clinical score that was maintained above 70 % at 9 months of age (Figure 1A). Reiterated measures ANOVA carried out from 10 to 39 weeks of age indicate a significant effect of the MuStem cell delivery ( $F=601.5$ ;  $p<0.001$ ) and the individual GRMD dog ( $F=143.9$ ;  $p<0.001$ ), as well as an interaction between cell delivery and time ( $F=3.7$ ;  $p<0.001$ ). The clinical course of three of the GRMD<sup>MuStem</sup> dogs (#7G<sup>Mu</sup> to #9G<sup>Mu</sup>) can be statistically distinguished from two of the mock GRMD dogs (#4G, #5G); the two other dogs (#6G, #10T) displaying an intermediate clinical course. General posture and stance were the most obvious corrected criterion in GRMD<sup>MuStem</sup> dogs (Figure 1, B and C representing #7T and #4G, respectively). Overall, these data demonstrate that combined intra-femoral injection and cardiac ventricle deposit allow global and persistent improvement of the GRMD dog clinical status.

### ***Tissular impact of MuStem cell delivery***

Histopathological analyses of skeletal muscles from all GRMD dogs show a typical dystrophic pattern including size variation among individual muscle fibres, individual fibre necrosis and calcification foci, as well as small regenerating basophilic fibres, numerous fibres with centrally located myonuclei and significant replacement of muscle tissue by connective tissue and, to a minor extent, adipose tissue (Figure 2, A and B). Histomorphometry analysis was performed on the *Biceps femoris* muscle of 9-months aged healthy dogs (#1H, #2H), mock GRMD dogs (#4G to #6G) and compared to GRMD<sup>MuStem</sup> dogs (#7G<sup>Mu</sup>, #8G<sup>Mu</sup>, #10G<sup>Mu</sup>). Based on the minimum Ferret diameter, we show that the mean fibre diameter is not discriminant between the groups (42.4±13.8, 34.8±16.8 and 34.0±15.0 µm for healthy, GRMD and GRMD<sup>MuStem</sup> dogs, respectively). The variation coefficients associated with fibre diameter measurements (32.4, 48.3 and 44.0 %, respectively) highlight the decreased anisocytosis observed in GRMD<sup>MuStem</sup> dogs compared to mock GRMD dogs ( $p < 0.0001$ ). Regenerative activity in the same samples is also assessed using a specific MyHCd labelling (Figure 2, C and D). While 4.8±2.4 % of fibres express this developmental isoform in mock GRMD dog muscles, the proportion of MyHCd<sup>+</sup> fibre is 16.9±10.5 % in GRMD<sup>MuStem</sup> dogs, demonstrating an increase in muscle regenerative activity following MuStem cell delivery ( $p < 0.001$ ). Immunofluorescent labelling of dystrophin in the *Biceps femoris* muscle shows no expression of this protein in mock GRMD dogs, apart from some rare positive fibres corresponding to revertant fibres. On the other hand, isolated or clustered dystrophin<sup>+</sup> fibres are scattered throughout the whole muscle section of GRMD<sup>MuStem</sup> dogs. These fibres are characterized by a global low expression level compared to that observed in healthy dog muscle and by a continuous or discontinuous labelling along the membrane (Figure 2, E-G; file 1: Figure S1). A nuclear counterstaining and bright field allow us to visualize the fibers in the muscle cryosection (Figure S2). Altogether, we demonstrate histological remodelling of the GRMD dog muscle following MuStem cell delivery, including a boost in its regenerative capacity, which is consistent with the clinical impairment observed in the treated dogs and a diffuse dystrophin restoration, albeit at a low level.

### ***Sample quality controls***

The quality of total RNA samples was checked on the Agilent 2100 bioanalyzer. The electropherogram of the six samples corresponding to two healthy dogs (#1H, #2H), two mock GRMD dogs (#4G, #5G), and two GRMD<sup>MuStem</sup> ones (#7T, #8T), shows an absence of degradation products in parallel with high RNA Integrity Numbers (RIN), validating the quality of all initial RNAs (Figure S3A). The canine gene expression microarray data reveals a homogenous signal intensity distribution across the samples (Figure S3B). The dendrogram plotted from the distance matrix of the overall expression signals shows that the healthy samples are grouped together, revealing the proximity between the mock GRMD and GRMD<sup>MuStem</sup> dog samples (Figure S3C).

### ***High-throughput characterization of GRMD dog model***

The statistical filtration and classification (Figure 3) allows the identification of 282 genes (corresponding to 430 probes) differentially expressed between healthy and GRMD dogs, thus providing a high-throughput characterization of the GRMD dog model. Thus, 218 genes (321 probes) and 64 genes (109 probes) are identified as significantly up-regulated and down-regulated, respectively (File S1). The vast majority of these genes show a slight amplification of the expression variation in the GRMD<sup>MuStem</sup> dog (Figure 4).

A comparison with human studies shows that, among the 282 genes differentially expressed between the GRMD and the healthy samples, 117 genes have been previously identified as differentially expressed in individuals with DMD in at least one of the studies considered [6,8–10]. Interestingly, 98% of these genes are either up- or down-regulated in both the GRMD dog model and the DMD patient. As reported in Table 3, among the genes that are common between our dataset and the human transcriptomic studies, we can identify significant enrichments of genes that are up-regulated or down-regulated in both canine and human studies.

The functional relevance of differentially expressed genes between GRMD dog and healthy dog muscle is determined using the GO terms [39] that are significantly enriched in these groups (Figure 5, File S2). Among the genes up-regulated in GRMD dog as compared to healthy dog, we find enrichment for processes such as *immune system process* (n=49,  $p < 2 \times 10^{-5}$ ), *inflammatory response* (n=17,  $p < 2 \times 10^{-4}$ ), *response to stimulus* (n=126,  $p < 7 \times 10^{-6}$ ), *response to stress* (n=75,  $p < 2 \times 10^{-4}$ ), *response to lipid* (n=28,  $p < 4 \times 10^{-4}$ ), *regeneration* (n=11,

$p < 2 \times 10^{-3}$ ) and *cell adhesion* ( $n=27$ ,  $p < 2 \times 10^{-4}$ ). Calcium and energy metabolism as well as extracellular matrix disorders are also represented by the enrichment of *calcium ion binding* ( $n=25$ ,  $p < 5 \times 10^{-5}$ ) and *extracellular matrix organization* ( $n=22$ ,  $p < 7 \times 10^{-8}$ ) in the up-regulated group of genes. The down-regulated group is significantly enriched in genes associated with terms involved in *oxidation-reduction processes* ( $n=23$ ,  $p < 6 \times 10^{-10}$ ), *regulation of transmembrane transporter activity* ( $n=5$ ,  $p < 5 \times 10^{-3}$ ), *mitochondrion* ( $n=29$ ,  $p < 7 \times 10^{-11}$ ) and *fatty acid beta-oxidation* ( $n=6$ ,  $p < 4 \times 10^{-4}$ ). Furthermore, five genes involved in apoptosis regulation are noted among the group of genes which are up-regulated and involved in the *regulation of protein secretion* ( $n=9$ ,  $p < 5 \times 10^{-3}$ ). Also, we detect an enrichment of the *membrane-bounded vesicle* ( $n=34$ ,  $p < 7 \times 10^{-5}$ ) term in the group of up-regulated genes in GRMD dog muscle as compared to healthy dog.

### ***Impact of MuStem cell delivery on GRMD skeletal muscle***

Thirty one genes (41 probes) are identified as differentially expressed as a consequence of MuStem cell administration (Figure 3, Figure S1). Sixteen genes (21 probes) are significantly up-regulated in GRMD<sup>MuStem</sup> dog muscle as compared to mock GRMD dog. Their expression profile shows a global tendency to increase in mock GRMD dog samples as compared to healthy dog (Figure 6, A). A significant down-regulation of expression is identified for 15 genes (20 probes) in GRMD<sup>MuStem</sup> as compared to mock GRMD dog muscle. Among these 31 genes, 8 show a slight decrease of expression in GRMD samples as compared to healthy samples, followed by a marked decrease in GRMD<sup>MuStem</sup> samples, while some other genes such as ST3GAL5, GATM or PSMB9 exhibit an increased expression in GRMD samples as compared to healthy sample followed by a significant decrease in GRMD<sup>MuStem</sup> samples.

The number of genes in these expression patterns is too small for a GO statistical analysis. Nevertheless, it is noteworthy that we can identify genes involved in processes such as *muscle regeneration*, *cellular homeostasis* as well as *metabolism*. Thus, the activation of satellite cells (MUSTN1) and muscle regeneration (SPP1, MYH3/MYH8, DEPTOR, KLHL31 and PSMB9) are affected by MuStem cell delivery, in parallel with genes involved in protein degradation, protein folding (FBXO32, TRIM63, ZFAND5 and MT2A) and the anti-apoptosis pathway (MCL1, AMIGO2). Two genes (PVALB and AQP4) are implicated in cell homeostasis and calcium / water homeostasis, respectively. In terms of metabolism, two genes (ST3GAL5, GPD1) related to lipid metabolism are down-regulated. ADIPOQ

represents a third example of the down-regulation of lipid metabolism. This latter gene is significantly up-regulated in mock GRMD dog muscle as compared to healthy dog, and has a tendency to be down-regulated in GRMD<sup>MuStem</sup> dog (FC -1.57). Five other genes play a role in glucose metabolism (AMPD3, DEPTOR, GATM, PFKFB1 and PPP1R3B).

### ***Real-time quantitative PCR validation of array results***

To validate the related microarray data, we chose 15 of the 31 differentially expressed genes in the GRMD<sup>MuStem</sup> dog group compared to mock GRMD dog (Figure 6A) to carry out real-time quantitative RT-PCR analysis. The selected genes show different representative profiles for GRMD *versus* healthy dog and GRMD<sup>MuStem</sup> *versus* GRMD dog. The RT-qPCR validations were performed on the same sample set as the microarray, and the third healthy dog (#3H) was also included. RT-qPCR FC values are calculated for GRMD *versus* healthy dog and GRMD<sup>MuStem</sup> *versus* GRMD dog comparisons (Figure 6B). All of the genes further analysed in this way show expression changes consistent with those estimated by gene chip analysis. Interestingly, the two samples from the same group yield closely similar relative quantifications (RQ) for a given gene, as illustrated for MUSTN1 and GPD1 (Figure 6C). In general, RT-qPCR nevertheless yields slightly higher values than those obtained in the microarray study, so this approach proves to be successful in validating microarray data.

## Discussion

Over the last fifteen years, several stem cell populations including mesoangioblasts, pericytes, CD133<sup>+</sup> cells, PICs cells, Aldh<sup>+</sup> cells, mesenchymal stem cells and Muscle-Derived Stem Cells (MDSC), have been tested in different dystrophic animal models and defined as having favourable engraftment properties and myogenic regenerative potential. Interestingly, some of these cells also exhibit an unexpected ability to migrate through vessels, leading us to consider a whole-body distribution using systemic delivery [40]. As GRMD dogs represent a large animal model having a pathogenesis very close to individuals with DMD, they are highly appropriate for preclinical studies aiming to identify a new therapeutic product. In 2011, using this clinically appropriate animal model, we showed that intra-arterial delivery of allogenic MuStem cells, a sub-type of MDSC, resulted in a limitation in the development of muscle damage and a long-term stabilization of the transplanted GRMD dog clinical status [28]. These data positioned this population as a promising candidate for cell-based therapeutic development dedicated to DMD. This persistent and generalized effect leads us to question the molecular impact of MuStem cells; hence, in this study, we make use of a MuStem cell transplantation programme to develop an expression profiling analysis, along with an investigation of the clinical and histological status. In parallel with the first high-throughput characterization of GRMD dog muscle, our study presents, without prior assumptions, the molecular effects underlying the effect of MuStem cell transplantation.

### ***Pathophysiology of GRMD dog is defined by a complex transcriptional remodelling***

Considering the state of the art in this field, we firstly need to establish, at a transcriptomic level, a referenced set of deregulated genes involved in the pathophysiology of GRMD dog. We find that up-regulated genes are significantly associated with genes bearing *regeneration*, *regulation of protein secretion* as well as *cell migration*. Three other biological processes, *i.e.*, *extracellular matrix organization*, *inflammatory response* and *cell adhesion*, which are known as being modulated in individuals with DMD [10,15], are significantly enriched in the identified differentially expressed genes. Furthermore, in accordance with the description of large caveolae observed in the plasmic membrane of myocytes in GRMD dog [23], we observe an enrichment of the *membrane-bounded vesicle* term when comparing our GRMD samples with healthy dog samples. In addition, down-regulated genes in GRMD dog muscle

are over-represented in metabolic processes, specifically involving the *carboxylic acid catabolic process*, *regulation of transmembrane transporter activity*, *fatty acid beta-oxidation*, as well as *oxidation-reduction* and *small-molecule metabolic processes*. These data are very well correlated with those previously obtained in individuals with DMD showing a differential gene profiling related to mitochondrial activity [41]. Overall, we show an altered expression profile of 282 genes, including 117 genes previously identified as differentially expressed in individuals with DMD in at least one of the studies concerned [6,8–10]. A possible limitation of the results presented here is that we compare immunosuppressed GRMD dogs with healthy dogs that were not submitted to an immunosuppressive regimen known to impact on the GRMD dog phenotype [42,43]. Despite this, importantly, 98% of these genes are similarly differentially regulated in both GRMD dogs and individuals with DMD, and we show a significant enrichment of up-regulated or down-regulated genes in both dog and human studies, confirming that our experimental design in GRMD dog is appropriate for the investigation of DMD disease. These findings validate our strategy and also reinforce the evidence for molecular modifications observed after MuStem cell transplantation. Finally, our transcriptomic results obtained the first expression profile of GRMD dogs with an advanced age of 9 months yield new informative data on the expression profile of dystrophic dog muscle, clearly illustrating that the consequences of the lack of dystrophin are multiple and associated with a profound tissue remodelling, as shown by the involvement of a large number of biological processes.

### ***MuStem cell administration enhance long-term skeletal muscle fibre regeneration***

In our previous study, we demonstrate that one of the consequences of MuStem cell systemic delivery is histological remodelling, with a major increase in the muscle fibre regeneration activity observed several weeks after cell delivery. The skeletal muscle samples from the dogs used in the present study similarly show a striking increased proportion of newly formed/regenerated muscle fibre, which is revealed by the expression of developmental myosin heavy chain isoform in transplanted GRMD dog muscle four months after systemic administration. This result highlights that transplanted MuStem cells actively contribute to persistent stimulation of muscle fibre formation, as shown at the molecular level by the identification of up-regulated genes including MUSNT1 (musculoskeletal embryonic nuclear protein1) and SPP1 (Secreted PhosphoProtein 1), which are implicated in myogenesis,

regeneration and cell differentiation. MUSNT1 is a key regulator of myogenic differentiation and fusion [44], and has been shown to be up-regulated following the differentiation of porcine myoblasts into myotubes [45]. Interestingly, the expression of this gene has been recently demonstrated in adult regenerating skeletal muscle, activated satellite cells and differentiating myoblasts [46]. SPP1, also named osteopontin, is an adhesive component of the extracellular matrix that also exists as a soluble molecule. It is described as a key cytokine regulating tissue repair, inflammation and fibrosis [47,48]. In injured muscle, SPP1 promotes macrophage binding to necrotic fibres, and thus may be important in mediating the early phase of muscle regeneration [49]. More recently, myoblasts have also been presented as an important source of SPP1 in damaged muscles, where its released may assist in controlling both myogenic and inflammatory processes during the early stages of muscle regeneration [50]. Concomitantly, we also find that developmentally regulated genes, known to be transiently expressed during muscle development and regeneration, such as ACTC1 (actin, alpha, cardiac muscle 1) and MYH3/MYH8 isoforms are significantly up-regulated in the GRMD<sup>MuStem</sup> dog with advancing age. Interestingly, such enhanced expression of ACTC1, embryonic myosin heavy chain, versican, perinatal myosin heavy chain, embryonic myosin light chain has also been documented in individuals with DMD [6]. Lastly, we observe a decreased expression of the DEP domain containing MTOR-interacting protein (DEPTOR), which is described to negatively regulate muscle proliferation and differentiation via the regulation of cell cycle regulatory proteins as well as muscle protein synthesis [51]. Considering that transcriptomic analyses were performed four months after cell transplantation, these results collectively reveal, for the first time with a molecular signature, that MuStem cells may contribute to muscle fibre regeneration and repair.

### ***MuStem cell administration enhances protein degradation in an ubiquitin-dependent manner***

The regulatory role of the ubiquitin proteasome system (UPS) ensures the clearance of dysfunctional or denatured proteins. In a muscular context, the UPS has been shown to have a role in the mediation of skeletal muscle atrophy [52–54]. In a pathological context such as myopathy, skeletal muscle requires a rapid and efficient system for the removal of altered organelles, the elimination of protein aggregates, and the disposal of toxic products that may lead to cell death, thus allowing for the proper contraction of sarcomeres [55]. UPS is thus

involved in protein quality control, and the two ubiquitin ligases atrogin-1 and MURF1, which are associated with autophagy-lysosome systems, can ensure the rapid elimination of single proteins or small aggregates [56–58]. Autophagy is required for cellular survival, and this new concept changes the current view that proteolysis is detrimental; the new vision is to consider transitory activation of the proteolytic systems to eliminate misfolded muscle proteins in myopathy [58]. In human heart failure syndromes, recent evidence supports a role for protein damage and impaired clearance of damaged proteins in the pathology, and highlights the UPS as the primary effector of regulatory control [59]. In the present study, we show that MuStem cell transplantation stimulates the expression of several genes involved in the protein degradation machinery via this system. Specifically, FBXO32 (Atrogin 1), TRIM63 (MURF1), ZFAND5 and MT2A encode proteins of the E3 ubiquitin ligase complex, which mediates the ubiquitination, and subsequent proteasomal degradation of target proteins. This suggests that muscle tissue remodelling resulting from MuStem cell transplantation may involve preliminary UPS proteins and associated proteins such as metallothioneins in order to clear misfolded proteins. These latter could be toxic to myogenic cells, and have to be eliminated prior to efficient muscle fibre formation. After MuStem cell transplantation, a reversal is observed in the expression level of the subunit LMP-2 (PSMB9 gene), which is significantly up-regulated in GRMD dog as compared to healthy dog, strongly suggesting that protein degradation required for skeletal muscle regeneration is mainly mediated in an ubiquitin-dependent manner.

### ***MuStem cell administration induces insulin resistance in skeletal muscle***

Based on under-representation of several key enzymes that control both glycolytic and oxidative metabolism, we have previously shown a dramatic alteration of metabolic proteins in GRMD dog *versus* healthy dog [25]. Skeletal muscle is responsible for 70 to 80% of whole body uptake, disposal, and storage of insulin-stimulated glucose. Therefore, we consider that skeletal muscle plays a major role in energy balance. Furthermore, skeletal muscle has an influence on the metabolism and storage of lipids and plays an important role in hormone signalling [60]. Insulin resistance in adipocytes induced by TNF $\alpha$  is accompanied by an increased GM3 biosynthesis through the up-regulation of GM3 synthase (ST3GAL5) gene expression [61]. In the present study, we find that the level of GM3 synthase mRNA is significantly higher in GRMD dog muscle than in healthy dog, possibly reflecting adipose tissue infiltration and, more generally, the participation of GM3 synthesis in abnormal insulin

resistance in GRMD dog. It is interesting to note that, after MuStem cell transplantation, skeletal muscle is characterized by a reversal in the expression level of ST3GAL5, which could represent the molecular hallmark of a decrease in infiltrating adipose tissue, triglyceride synthesis and an improved insulin signalling after cell transplantation [62]. This hypothesis is supported by the fact that, similarly, the expression of Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (GPD1), equally involved in insulin metabolism, is significantly decreased in GRMD<sup>MuStem</sup>.

Muscle glycogen accumulation results from the disruption of the insulin pathway influencing glucose metabolism and transport, and has been demonstrated in *mdx* mice [63] and individuals with DMD [64,65]. Such accumulation is accompanied by elevated glycogen synthase activity and protein expression. In a previous proteomic study performed on GRMD dog muscle, we observed an increased level of protein phosphatase 1 (PP1) concomitantly with a decrease in the level of its major deactivator, glycogen synthase kinase (GSK)-3 $\beta$  [24]. Consistent with this result, we demonstrate the down-expression in GRMD<sup>MuStem</sup> dog muscle of both genes encoding the proteins PP1R3B (Protein Phosphatase 1, regulatory subunit 3B) and PVALB (parvalbumin) that are involved in glycogen synthesis. These genes belong to the same regulatory network as the muscular adiponectin (ADIPOQ), which is known to regulate glucose and fatty acid metabolism both directly and via insulin sensitizing effects [66]. Also, it is proposed that its up-regulation probably reflects adipose tissue infiltration [67]. Here, we observe a significant over-expression of this gene in GRMD dog muscle, followed by a slight tendency to decreased gene expression four months after MuStem cell transplantation, which is confirmed by RT-qPCR. Since adiponectin elicits important functional effects on skeletal muscle [68] and can generate beneficial metabolic effects, as recently established in diabetes [69], while its local production is also associated with increased insulin sensitivity [70], further experiments need to be performed to refine the role of MuStem cells in the adiponectin-dependent regulatory pathway. Overall, these new molecular results give compelling evidence suggesting that MuStem cells influence insulin resistance and glucose and fatty acid metabolism in GRMD dog muscle.

### ***MuStem cell administration causes an up-regulation of the creatine synthetic pathway***

L-arginine:glycine amidinotransferase (GATM or AGAT) is a mitochondrial enzyme that belongs to the amidinotransferase family and catalyzes the first step of creatine synthesis. It is involved in many metabolic (threonine, serine, arginine, proline) pathways, in creatine

biosynthesis and in tissue regeneration [71]. GATM was found to be up-regulated in *mdx* mice, and it has been proposed that the up-regulation of the creatine synthetic pathway may help maintaining muscle creatine levels and limiting cellular energy failure in *mdx* skeletal muscles [72]. Among the differentially expressed genes identified herein, GATM exhibited an up-expression in GRMD muscle that could directly point out depletion of the muscle creatine pool occurring in highly and continuously remodeling muscle tissue. Interestingly, a 2-fold decrease was determined four months after MuStem cell transplantation, based on independent analysis of three probes. Then, GATM expression level is similar to those of the healthy dog muscle, which could evoke a less creatine synthesis requirement correlated to a better muscle fascicle organization following increased muscle fiber regeneration.

## Conclusions

In summary, concomitantly to validation of the therapeutic potential of MuStem cell systemic delivery the large-scale transcriptomic approach presented here allow us to have for the first time a global view of an adult stem cell transplantation effect on gene expression in DMD-like context. Interestingly, our results clearly reflect that MuStem cells impact on many biological processes several months after their transplantation that could explain the beneficial effect on dystrophic phenotype of GRMD<sup>MuStem</sup> dogs. Among these effects, gene expression profiling demonstrated an ability to maintain an intense muscle fiber regeneration activity that may play an essential role in stabilization of muscle tissue phenotype.

**List of abbreviations:** DMD, Duchenne Muscular Dystrophy; GRMD, Golden Retriever Muscular Dystrophy; GRMD<sup>MuStem</sup>, GRMD dogs transplanted with MuStem cells; GO, Gene Ontology.

## Acknowledgments

We thank the staff of the Boisbonne Centre (Oniris, Nantes, France) for the handling and care of the GRMD dog colony. We also are grateful to Catherine Chevalier for microarray experiments.

## References

1. Emery AE (1991) Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul Disord* 1: 19–29.
2. Bonilla E, Samitt CE, Miranda AF, Hays AP, Salviati G, et al. (1988) Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell* 54: 447–452.
3. Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51: 919–928.
4. Ervasti JM, Campbell KP (1991) Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 66: 1121–1131.
5. Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, et al. (1992) Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355: 696–702. doi:10.1038/355696a0.
6. Chen YW, Zhao P, Borup R, Hoffman EP (2000) Expression profiling in the muscular dystrophies: identification of novel aspects of molecular pathophysiology. *J Cell Biol* 151: 1321–1336.
7. Bakay M, Zhao P, Chen J, Hoffman EP (2002) A web-accessible complete transcriptome of normal human and DMD muscle. *Neuromuscul Disord* 12 Suppl 1: S125–41.
8. Haslett JN, Sanoudou D, Kho AT, Bennett RR, Greenberg S a, et al. (2002) Gene expression comparison of biopsies from Duchenne muscular dystrophy (DMD) and normal skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15000–15005. doi:10.1073/pnas.192571199.
9. Haslett J, Sanoudou D, Kho A, Han M, Bennett R, et al. (2003) Gene expression profiling of Duchenne muscular dystrophy skeletal muscle. *Neurogenetics* 4: 163–171. doi:10.1007/s10048-003-0148-x.
10. Pescatori M, Broccolini A, Minetti C, Bertini E, Bruno C, et al. (2007) Gene expression profiling in the early phases of DMD: a constant molecular signature characterizes DMD muscle from early postnatal life throughout disease progression. *FASEB J* 21: 1210–1226. doi:10.1096/fj.06-7285com.
11. Tkatchenko a V, Le Cam G, Léger JJ, Dechesne C a (2000) Large-scale analysis of differential gene expression in the hindlimb muscles and diaphragm of mdx mouse. *Biochim Biophys Acta* 1500: 17–30.
12. Rouger K, Le Cunff M, Steenman M, Potier M-C, Gibelin N, et al. (2002) Global/temporal gene expression in diaphragm and hindlimb muscles of dystrophin-deficient (mdx) mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C773–84. doi:10.1152/ajpcell.00112.2002.
13. Porter JD, Merriam a. P, Leahy P, Gong B, Khanna S (2003) Dissection of temporal gene expression signatures of affected and spared muscle groups in dystrophin-deficient (mdx) mice. *Hum Mol Genet* 12: 1813–1821. doi:10.1093/hmg/ddg197.
14. Porter JD, Merriam AP, Leahy P, Gong B, Feuerman J, et al. (2004) Temporal gene expression profiling of dystrophin-deficient (mdx) mouse diaphragm identifies

- conserved and muscle group-specific mechanisms in the pathogenesis of muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 13: 257–269. doi:10.1093/hmg/ddh033.
15. Marotta M, Ruiz-Roig C, Sarria Y, Peiro JL, Nuñez F, et al. (2009) Muscle genome-wide expression profiling during disease evolution in mdx mice. *Physiol Genomics* 37: 119–132. doi:10.1152/physiolgenomics.90370.2008.
  16. Nakamura A, Kobayashi M, Kuraoka M, Yuasa K, Yugeta N, et al. (2013) Initial pulmonary respiration causes massive diaphragm damage and hyper-CKemia in Duchenne muscular dystrophy dog. *Sci Rep* 3: 2183. doi:10.1038/srep02183.
  17. 't Hoen PAC, van der Wees CGC, Aartsma-Rus A, Turk R, Goyenvalle A, et al. (2006) Gene expression profiling to monitor therapeutic and adverse effects of antisense therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Pharmacogenomics* 7: 281–297. doi:10.2217/14622416.7.3.281.
  18. Baban D, Davies KE (2008) Microarray analysis of mdx mice expressing high levels of utrophin: therapeutic implications for dystrophin deficiency. *Neuromuscul Disord* 18: 239–247. doi:10.1016/j.nmd.2007.11.011.
  19. Cooper BJ, Winand NJ, Stedman H, Valentine BA, Hoffman EP, et al. (1988) The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature* 334: 154–156.
  20. Valentine BA, Cooper BJ, de Lahunta A, O'Quinn R, Blue JT (1988) Canine X-linked muscular dystrophy: An animal model of Duchenne muscular dystrophy: Clinical studies. *J Neurol Sci* 88: 69–81. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0022-510X(88)90206-7.
  21. Ambrósio CE, Fadel L, Gaiad TP, Martins DS, Araújo KPC, et al. (2009) Identification of three distinguishable phenotypes in golden retriever muscular dystrophy. *Genet Mol Res* 8: 389–396.
  22. Kornegay JN, Bogan JR, Bogan DJ, Childers MK, Li J, et al. (2012) Canine models of Duchenne muscular dystrophy and their use in therapeutic strategies. *Mamm Genome* 23: 85–108. doi:10.1007/s00335-011-9382-y.
  23. Valentine BA, Cooper BJ, Cummings JF, de Lahunta A (1990) Canine X-linked muscular dystrophy: morphologic lesions. *J Neurol Sci* 97: 1–23.
  24. Feron M, Guevel L, Rouger K, Dubreil L, Arnaud M-C, et al. (2009) PTEN contributes to profound PI3K/Akt signaling pathway deregulation in dystrophin-deficient dog muscle. *Am J Pathol* 174: 1459–1470. doi:10.2353/ajpath.2009.080460.
  25. Guevel L, Lavoie JR, Perez-Iratxeta C, Rouger K, Dubreil L, et al. (2011) Quantitative proteomic analysis of dystrophic dog muscle. *J Proteome Res* 10: 2465–2478. doi:10.1021/pr2001385.
  26. Nghiem PP, Hoffman EP, Mittal P, Brown KJ, Schatzberg SJ, et al. (2013) Sparing of the dystrophin-deficient cranial sartorius muscle is associated with classical and novel hypertrophy pathways in GRMD dogs. *Am J Pathol* 183: 1411–1424. doi:10.1016/j.ajpath.2013.07.013.
  27. Qu Z, Balkir L, van Deutekom JC, Robbins PD, Pruchnic R, et al. (1998) Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy. *J Cell Biol* 142: 1257–1267.
  28. Rouger K, Larcher T, Dubreil L, Deschamps J-Y, Le Guiner C, et al. (2011) Systemic delivery of allogenic muscle stem cells induces long-term muscle repair and clinical

- efficacy in duchenne muscular dystrophy dogs. *Am J Pathol* 179: 2501–2518. doi:10.1016/j.ajpath.2011.07.022.
29. Honeyman K, Carville KS, Howell JM, Fletcher S, Wilton SD (1999) Development of a snapback method of single-strand conformation polymorphism analysis for genotyping Golden Retrievers for the X-linked muscular dystrophy allele. *Am J Vet Res* 60: 734–737.
  30. Thibaud J-L, Monnet A, Bertoldi D, Barthélémy I, Blot S, et al. (2007) Characterization of dystrophic muscle in golden retriever muscular dystrophy dogs by nuclear magnetic resonance imaging. *Neuromuscul Disord* 17: 575–584. doi:10.1016/j.nmd.2007.03.013.
  31. Chalmel F, Primig M (2008) The Annotation, Mapping, Expression and Network (AMEN) suite of tools for molecular systems biology. *BMC Bioinformatics* 9: 86. doi:10.1186/1471-2105-9-86.
  32. Ritchie ME, Silver J, Oshlack A, Holmes M, Diyagama D, et al. (2007) A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics* 23: 2700–2707. doi:10.1093/bioinformatics/btm412.
  33. Smyth GK (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3: Article3. doi:10.2202/1544-6115.1027.
  34. Kent WJ (2002) BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res* 12: 656–664. doi:10.1101/gr.229202. Article published online before March 2002.
  35. Rustici G, Kolesnikov N, Brandizi M, Burdett T, Dylag M, et al. (2013) ArrayExpress update--trends in database growth and links to data analysis tools. *Nucleic Acids Res* 41: D987–90. doi:10.1093/nar/gks1174.
  36. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. (2014). *Nucleic Acids Res* 42: D7–D17. doi:10.1093/nar/gkt1146.
  37. Chen R, Li L, Butte AJ (2007) AILUN: reannotating gene expression data automatically. *Nat Methods* 4: 879. doi:10.1038/nmeth1107-879.
  38. Allamand V, Campbell KP (2000) Animal models for muscular dystrophy: valuable tools for the development of therapies. *Hum Mol Genet* 9: 2459–2467.
  39. Blake JA, Dolan M, Drabkin H, Hill DP, Li N, et al. (2013) Gene Ontology annotations and resources. *Nucleic Acids Res* 41: D530–5. doi:10.1093/nar/gks1050.
  40. Govoni A, Magri F, Brajkovic S, Zanetta C, Faravelli I, et al. (2013) Ongoing therapeutic trials and outcome measures for Duchenne muscular dystrophy. *Cell Mol Life Sci*. doi:10.1007/s00018-013-1396-z.
  41. Kuznetsov A V, Winkler K, Wiedemann FR, von Bossanyi P, Dietzmann K, et al. (1998) Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of the dystrophin-deficient mdx mouse. *Mol Cell Biochem* 183: 87–96.
  42. Liu JMK, Okamura CS, Bogan DJ, Bogan JR, Childers MK, et al. (2004) Effects of prednisone in canine muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 30: 767–773. doi:10.1002/mus.20154.

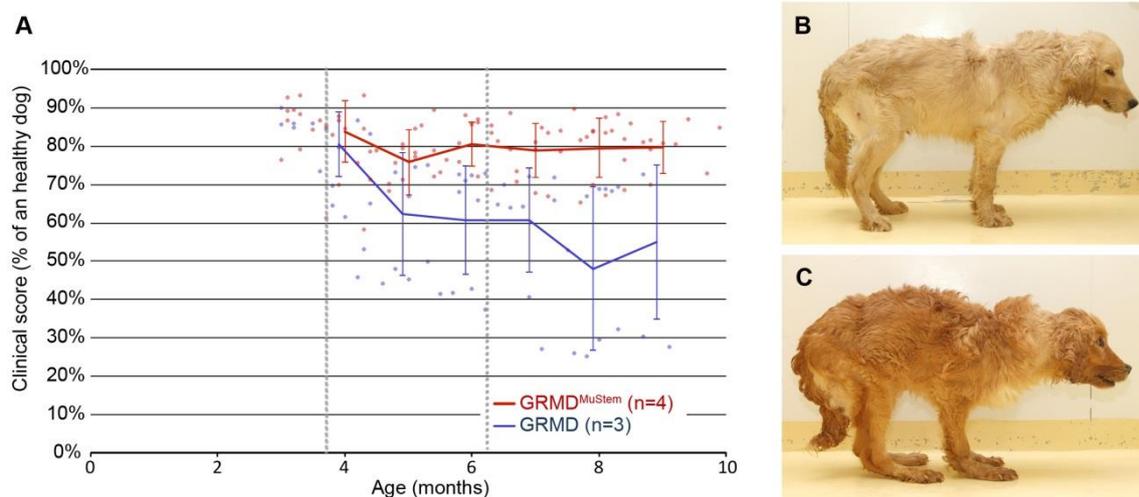
43. Barthélémy I, Uriarte A, Drougard C, Unterfinger Y, Thibaud J-L, et al. (2012) Effects of an immunosuppressive treatment in the GRMD dog model of Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 7: e48478. doi:10.1371/journal.pone.0048478.
44. Liu C, Gersch R (2010) Silencing of *Mustn1* inhibits myogenic fusion and differentiation. *Am J ...*: 1100–1108. doi:10.1152/ajpcell.00553.2009.
45. Jensen JH, Conley LN, Hedegaard J, Nielsen M, Young JF, et al. (2012) Gene expression profiling of porcine skeletal muscle in the early recovery phase following acute physical activity. *Exp Physiol* 97: 833–848. doi:10.1113/expphysiol.2011.063727.
46. Krause MP, Moradi J, Coleman SK, D'Souza DM, Liu C, et al. (2013) A novel GFP reporter mouse reveals *Mustn1* expression in adult regenerating skeletal muscle, activated satellite cells and differentiating myoblasts. *Acta Physiol (Oxf)* 208: 180–190. doi:10.1111/apha.12099.
47. O'Regan a, Berman JS (2000) Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int J Exp Pathol* 81: 373–390.
48. Mori R, Shaw TJ, Martin P (2008) Molecular mechanisms linking wound inflammation and fibrosis: knockdown of osteopontin leads to rapid repair and reduced scarring. *J Exp Med* 205: 43–51. doi:10.1084/jem.20071412.
49. Hirata A, Masuda S, Tamura T, Kai K, Ojima K, et al. (2003) Expression profiling of cytokines and related genes in regenerating skeletal muscle after cardiotoxin injection: a role for osteopontin. *Am J Pathol* 163: 203–215. doi:10.1016/S0002-9440(10)63644-9.
50. Uaesoontrachoon K, Yoo H-J, Tudor EM, Pike RN, Mackie EJ, et al. (2008) Osteopontin and skeletal muscle myoblasts: association with muscle regeneration and regulation of myoblast function in vitro. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 2303–2314. doi:10.1016/j.biocel.2008.03.020.
51. Kazi A a, Hong-Brown L, Lang SM, Lang CH (2011) Deptor knockdown enhances mTOR Activity and protein synthesis in myocytes and ameliorates disuse muscle atrophy. *Mol Med* 17: 925–936. doi:10.2119/molmed.2011.00070.
52. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, et al. (2001) Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294: 1704–1708. doi:10.1126/science.1065874.
53. Fareed M, Evenson A (2006) Treatment of rats with calpain inhibitors prevents sepsis-induced muscle proteolysis independent of atrogen-1/MAFbx and MuRF1 expression. *Am J ...* 02215: 1589–1597. doi:10.1152/ajpregu.00668.2005.
54. Kunkel SD, Suneja M, Ebert SM, Bongers KS, Fox DK, et al. (2011) mRNA expression signatures of human skeletal muscle atrophy identify a natural compound that increases muscle mass. *Cell Metab* 13: 627–638. doi:10.1016/j.cmet.2011.03.020.
55. Sandri M, Coletto L, Grumati P, Bonaldo P (2013) Misregulation of autophagy and protein degradation systems in myopathies and muscular dystrophies. *J Cell Sci* 126: 5325–5333. doi:10.1242/jcs.114041.
56. Cotten SW, Kornegay JN, Bogan DJ, Wadosky KM, Patterson C, et al. (2013) Genetic myostatin decrease in the golden retriever muscular dystrophy model does not

- significantly affect the ubiquitin proteasome system despite enhancing the severity of disease. *Am J Transl Res* 6: 43–53.
57. Grumati P, Coletto L, Sabatelli P, Cescon M, Angelin A, et al. (2010) Autophagy is defective in collagen VI muscular dystrophies, and its reactivation rescues myofiber degeneration. *Nat Med* 16: 1313–1320. doi:10.1038/nm.2247.
  58. Masiero E, Sandri M (2010) Autophagy inhibition induces atrophy and myopathy in adult skeletal muscles. *Autophagy* 6: 307–309.
  59. Willis MS, Bevilacqua A, Pulinilkunnil T, Kienesberger P, Tannu M, et al. (2013) The role of ubiquitin ligases in cardiac disease. *J Mol Cell Cardiol.* doi:10.1016/j.yjmcc.2013.11.008.
  60. Cruz Guzmán ODR, Chávez García AL, Rodríguez-Cruz M (2012) Muscular dystrophies at different ages: metabolic and endocrine alterations. *Int J Endocrinol* 2012: 485376. doi:10.1155/2012/485376.
  61. Tagami S, Inokuchi Ji J, Kabayama K, Yoshimura H, Kitamura F, et al. (2002) Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. *J Biol Chem* 277: 3085–3092. doi:10.1074/jbc.M103705200.
  62. Park J-J, Berggren JR, Hulver MW, Houmard JA, Hoffman EP (2006) GRB14, GPD1, and GDF8 as potential network collaborators in weight loss-induced improvements in insulin action in human skeletal muscle. *Physiol Genomics* 27: 114–121. doi:10.1152/physiolgenomics.00045.2006.
  63. Stapleton DI, Lau X, Flores M, Trieu J, Gehrig SM, et al. (2014) Dysfunctional Muscle and Liver Glycogen Metabolism in mdx Dystrophic Mice. *PLoS One* 9: e91514. doi:10.1371/journal.pone.0091514.
  64. Wakai S, Minami R, Kameda K, Okabe M, Nagaoka M, et al. (1988) Electron microscopic study of the biopsied cardiac muscle in Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 84: 167–175.
  65. Watkins SC, Cullen MJ (1987) A qualitative and quantitative study of the ultrastructure of regenerating muscle fibres in Duchenne muscular dystrophy and polymyositis. *J Neurol Sci* 82: 181–192.
  66. Jortay J, Senou M, Abou-Samra M, Noel L, Robert A, et al. (2012) Adiponectin and skeletal muscle: pathophysiological implications in metabolic stress. *Am J Pathol* 181: 245–256. doi:10.1016/j.ajpath.2012.03.035.
  67. Delaigle AM, Senou M, Guiot Y, Many M-C, Brichard SM (2006) Induction of adiponectin in skeletal muscle of type 2 diabetic mice: In vivo and in vitro studies. *Diabetologia* 49: 1311–1323. doi:10.1007/s00125-006-0210-y.
  68. Guerre-Millo M (2008) Adiponectin: an update. *Diabetes Metab* 34: 12–18. doi:10.1016/j.diabet.2007.08.002.
  69. Liu Y, Sweeney G (2014) Adiponectin action in skeletal muscle. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 28: 33–41. doi:10.1016/j.beem.2013.08.003.
  70. Liu Y, Chewchuk S, Lavigne C, Brûlé S, Pilon G, et al. (2009) Functional significance of skeletal muscle adiponectin production, changes in animal models of obesity and diabetes, and regulation by rosiglitazone treatment. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E657–64. doi:10.1152/ajpendo.00186.2009.

71. Humm A, Fritsche E, Steinbacher S, Huber R (1997) Crystal structure and mechanism of human L-arginine:glycine amidinotransferase: a mitochondrial enzyme involved in creatine biosynthesis. *EMBO J* 16: 3373–3385. doi:10.1093/emboj/16.12.3373.
72. McClure WC, Rabon RE, Ogawa H, Tseng BS (2007) Upregulation of the creatine synthetic pathway in skeletal muscles of mature mdx mice. *Neuromuscul Disord* 17: 639–650. doi:10.1016/j.nmd.2007.04.008.



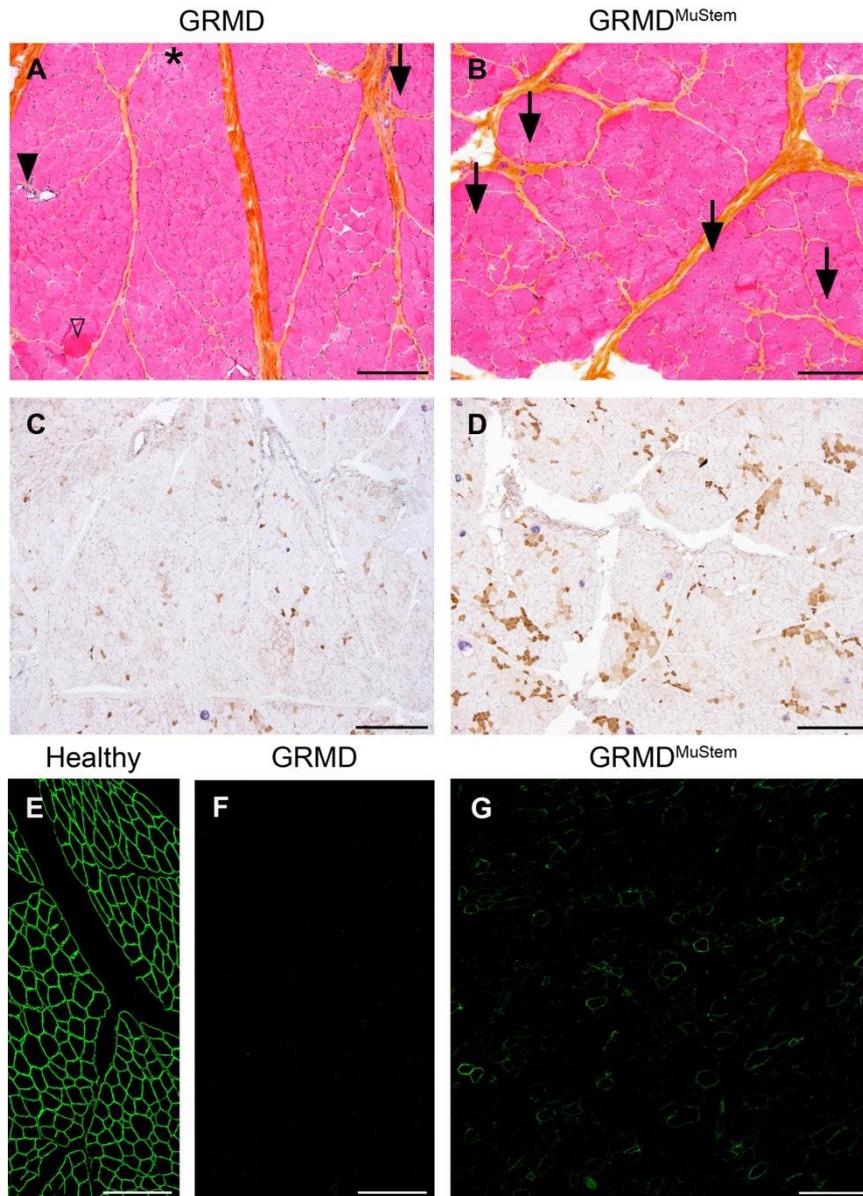
# Figures



**Figure 1. Clinical follow-up.**

A) Mean clinical scores of mock GRMD dogs and MuStem cell-injected dogs. The clinical score of each GRMD dog was assessed weekly and expressed as a percentage of a theoretical healthy dog score. Limits of the MuStem cell delivery window are indicated (dashed lines). B) Right lateral view of a treated GRMD dog. C) Right lateral view of mock GRMD dog. Note the anterior weight transfer and plantigrady.

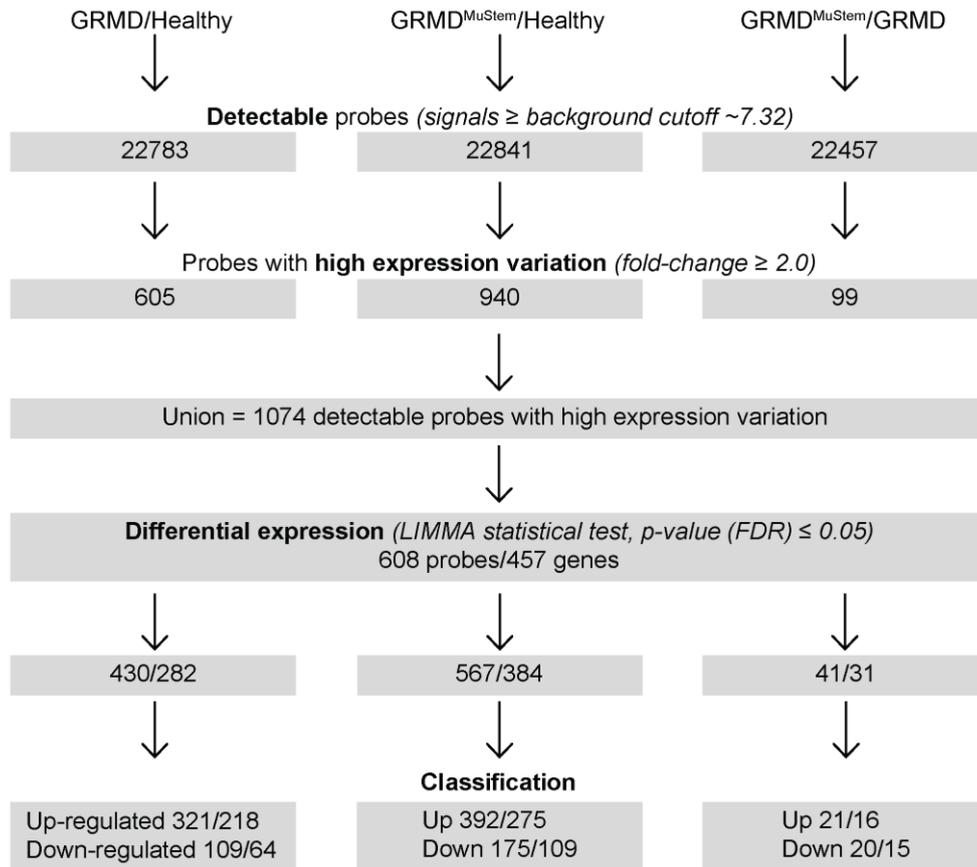




**Figure 2. Histological analysis of the *Biceps femoris* muscle of 9-month old dogs.**

A) Muscle tissue of mock GRMD dogs display a typical dystrophinopathic pattern with diffuse anisocytosis, hypertrophic hyalin fibres (open arrowhead), centronucleated fibres (arrow), necrotic fibres (\*), regenerative foci (black arrowhead) and multifocal thickening of the endomysial space by fibrosis (highlighted by the saffron yellow staining). B) The dystrophinopathic pattern is remodelled in treated GRMD dogs: anisocytosis is milder, hypertrophic hyalin fibres and necrotic fibres are less numerous, whereas centronucleated fibres are more abundant (arrow) compared to untreated GRMD dogs. C-D) Regenerative activity of muscle fibres in mock (left panel) and MuStem cell-injected (right panel) GRMD dogs, as indicated after immunolabelling specific to the developmental isoform of the myosin heavy chain (MyHCd). E-G) Dystrophin expression in healthy (E), mock GRMD (F) and treated GRMD (G) dogs. A-B ; E-G) Scale bar = 200  $\mu\text{m}$ . C-D) Scale bar = 500  $\mu\text{m}$ .

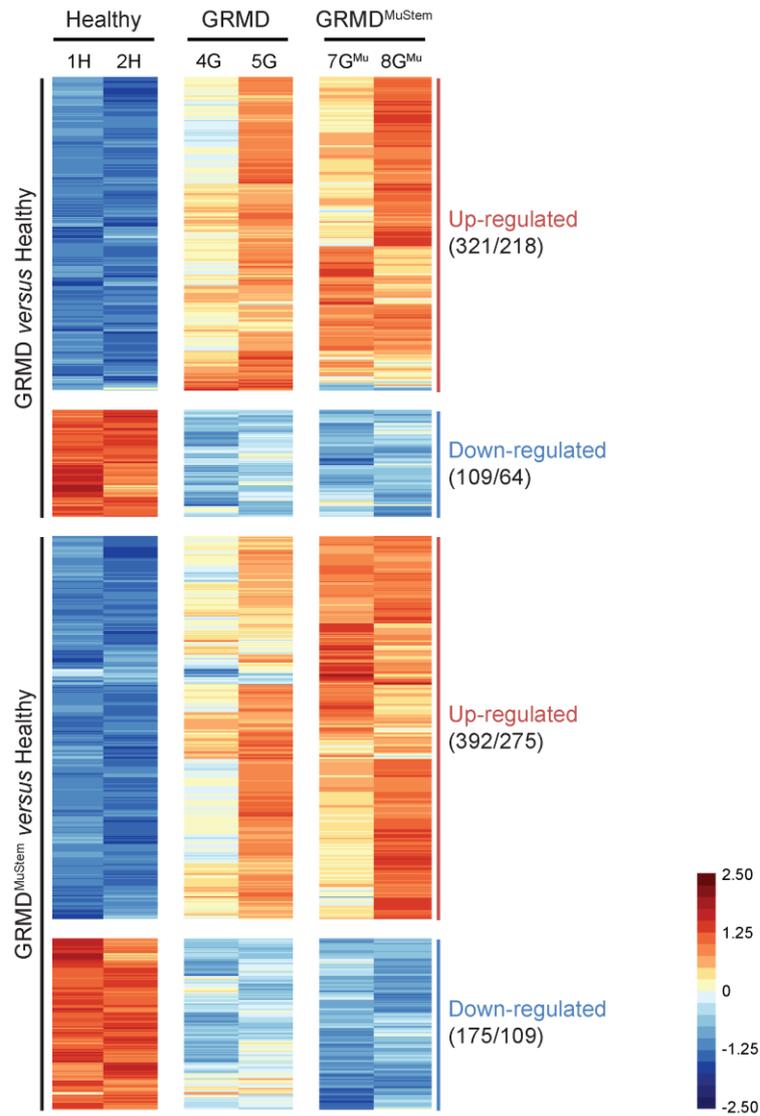




**Figure 3. Flow chart of the statistical filtration of microarray data.**

It lead to classification for each of the three pairwise comparisons of healthy, GRMD and treated GRMD dog muscle samples.

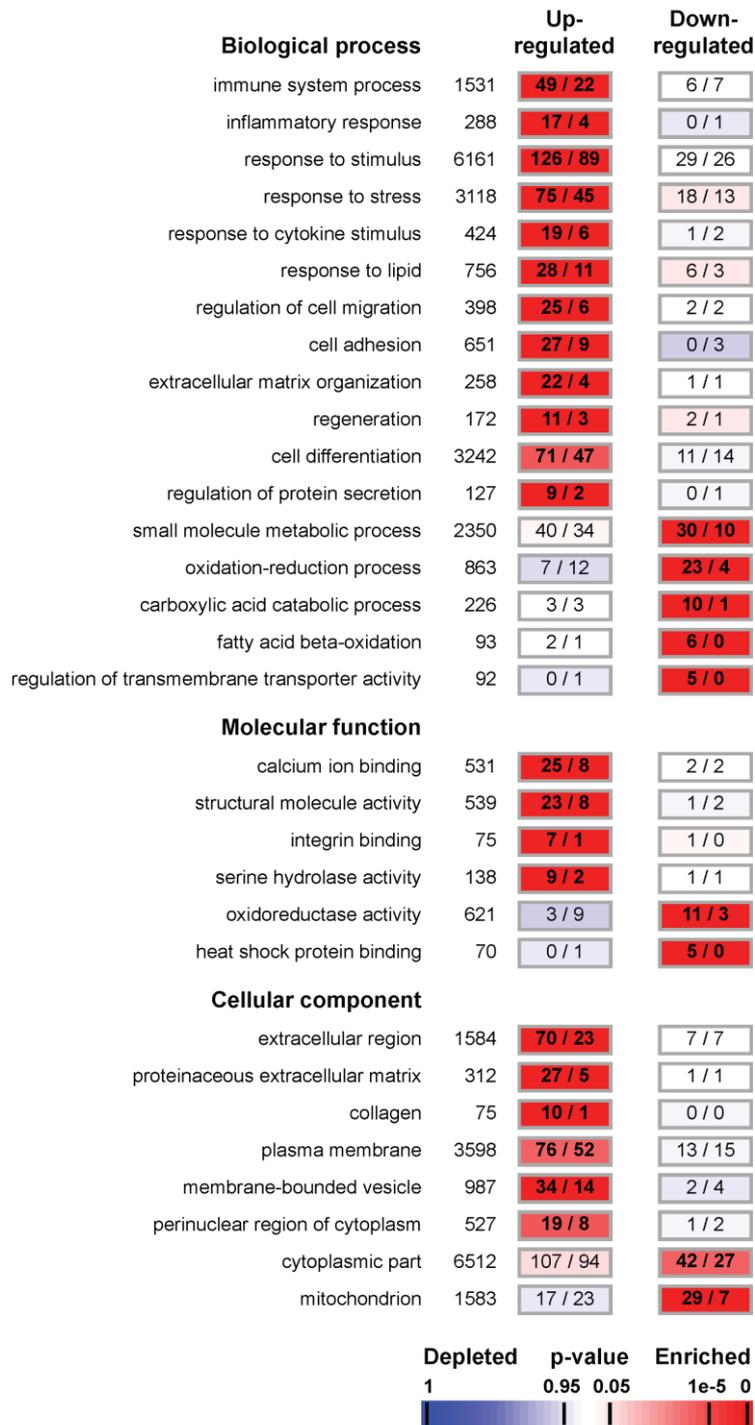




**Figure 4. Profiling of transcripts showing statistically significant changes between GRMD<sup>MuStem</sup>, GRMD and healthy dog.**

The number of probes / genes are indicated on the right below the corresponding expression pattern name. The standardized  $\log_2$ -transformed intensities are represented on a colour scale ranging from -2.50 (blue) to 2.50 (red) incremented by 0.25.

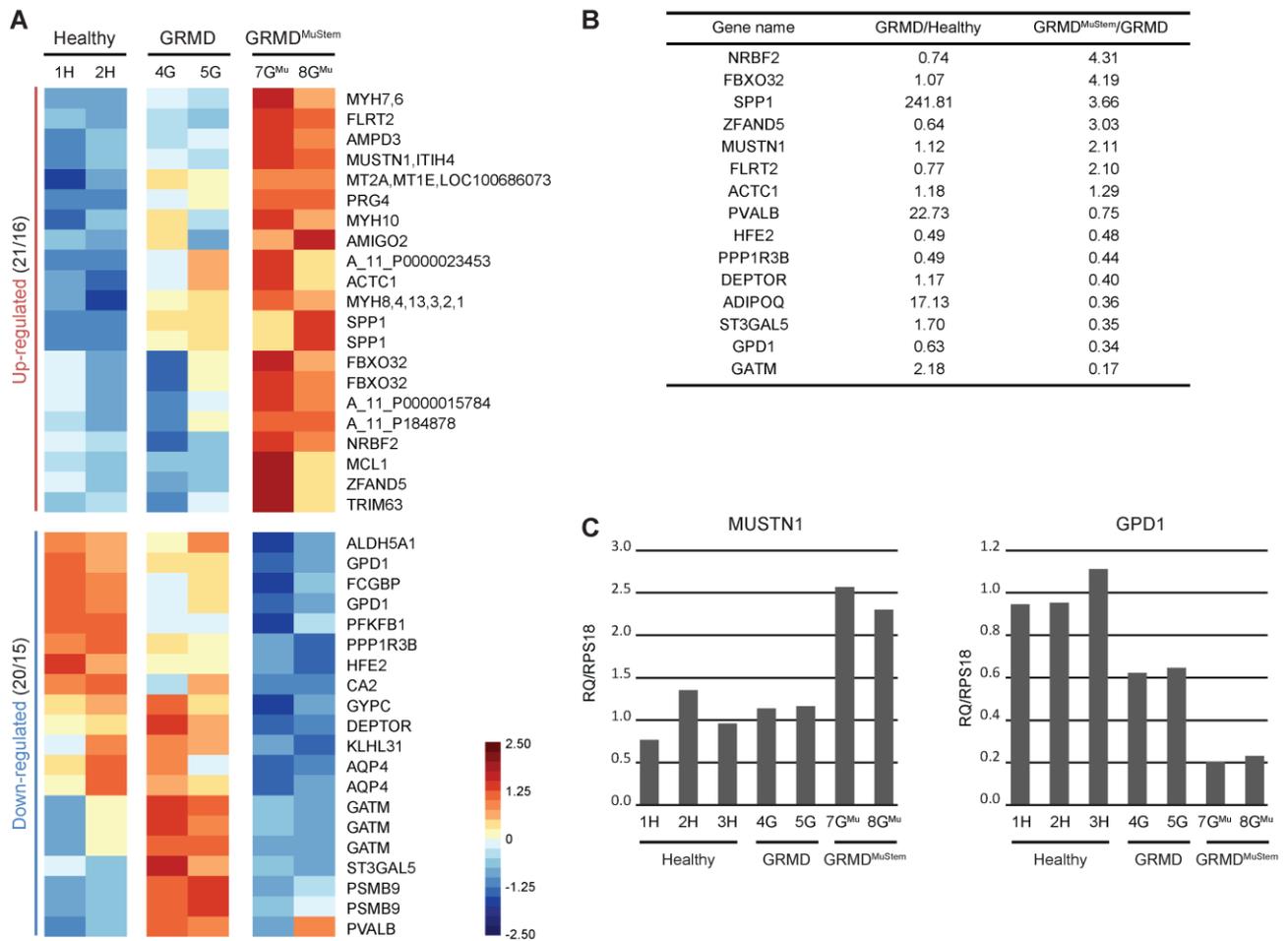




**Figure 5. Functional characterization of GRMD dog model.**

A selection of Gene Ontology (GO) terms significantly enriched in the groups of genes up- and down-regulated between GRMD dog model and healthy dog. Associated with the GO term, the total numbers of genes assigned with this annotation are indicated, followed in the rectangle by the number of genes observed (on left) and expected by chance (on right). Numbers in bold indicate a significant over-representation of the corresponding GO term. Enrichments are colour-coded according to the associated p-value from red (enriched) to blue (depleted).



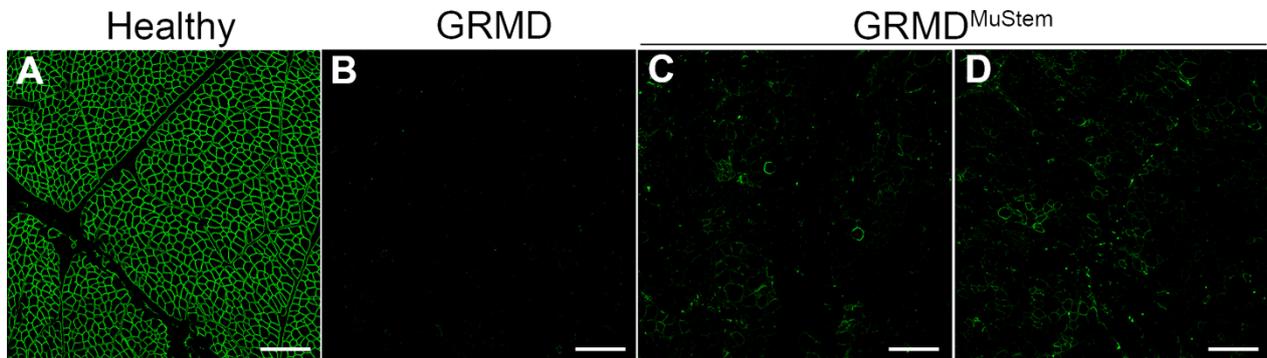


**Figure 6. Impact of MuStem cell systemic delivery on GRMD dog muscle.**

A) False-colour heatmap illustrating the transcripts significantly differentially expressed between treated GRMD dog and mock GRMD dog samples. Each line and column corresponds to a probe and an individual biological sample, respectively. The gene names assigned to each probe are indicated on the right, separated by a comma in the case of multiple names as for example with the myosin isoforms. The number of probes / genes are indicated beside each expression profile name. The standardized  $\log_2$ -transformed intensities are plotted with a colour scale ranging from -2.50 (blue) to 2.50 (red) incremented by 0.25. B) RT-qPCR validation of 15 genes. For each gene, fold change values are indicated for GRMD dog / healthy dog and treated GRMD dog / GRMD dog. C) Histograms of RT-qPCR for two genes: MUSTN1 and GPD1. Relative quantifications (RQ) are calculated by normalizing with respect to RPS18.

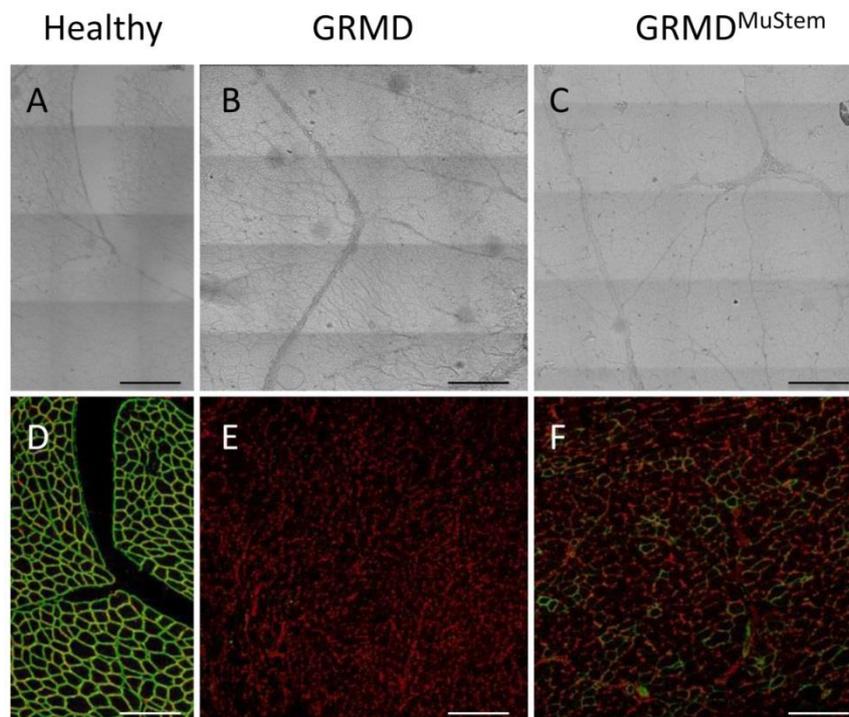


## Supporting Information



**Figure S1. Dystrophin expression profile in two supplementary treated GRMD dog muscle samples.**

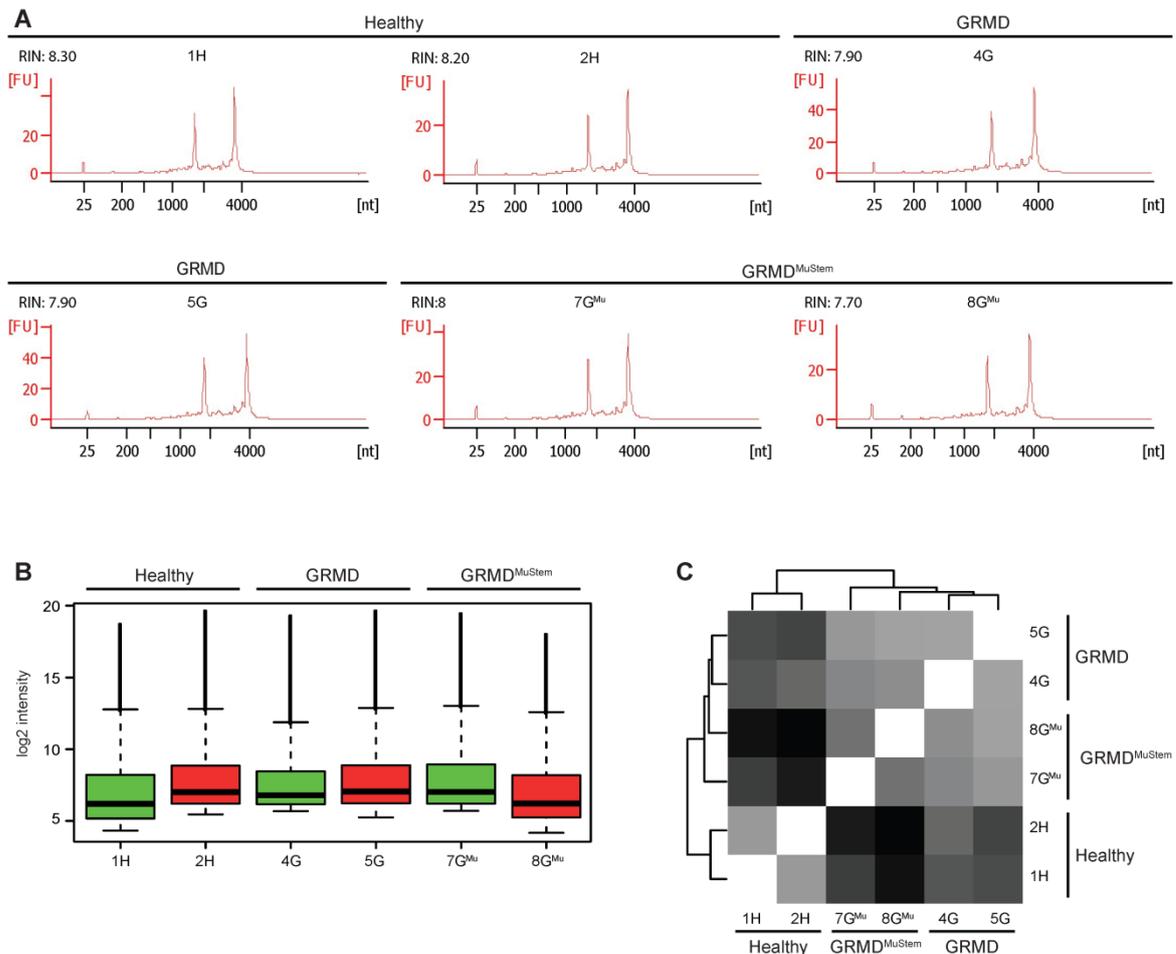
Transverse cryosections of the *Biceps femoris* muscle of 9-month-old healthy (A), mock GRMD (B) and two treated GRMD (C, D) dogs. Scale bar = 200  $\mu$ m.



**Figure S2. Combined Dystrophin immunolabelling and nuclear counterstaining.**

The first panel is a bright field illustration (A-C). Dystrophin expression in healthy (D), mock GRMD (E) and treated GRMD (F) dogs. Nuclear counterstaining is shown in red. Scale bar = 200  $\mu$ m.





**Figure S3. Total RNA and microarray data quality controls.**

A) Total RNA electropherograms. The RNA integrity numbers (RIN) are calculated for each sample. B) Distribution of the  $\log_2$ -transformed signal intensities of the duplicate healthy, GRMD and treated GRMD dog samples before normalization. C) Distance matrix of normalized expression data. The similarity between samples are colour-coded from white for the identity to black for the most dissimilar, allowing a clustering of the samples according to the dendrogram represented at the top and on the left.

**File S1 (.xlsx).** The file summarizes the 608 probes identified as differentially expressed in this study. Several types of information concerning annotation and classification are available, as well as comparisons with other human studies. Normalized and  $\log_2$ -transformed expression data are given for individual dog samples and averaged for healthy, GRMD and GRMD<sup>MuStem</sup> groups.

**File S2 (.xlsx).** The file contains the results of the Gene Ontology enrichment analysis for the group of genes differentially expressed in the GRMD sample as compared to the healthy dogs. “n” represents the total number of genes assigned using the Gene Ontology Term and in the considered group of genes. “nEXP” corresponds to the number of genes expected by chance.



# Tables

**Table 1. Description of the ten dogs used in the *in vivo* study.**

Group	Dog identification	Necropsy age (weeks)	Immunosuppression	Microarray sample
Healthy	1H	38	None	Yes
	2H	41	None	Yes
	3H	41	None	No
GRMD	4G	41	CSA-AZA	Yes
	5G	40	CSA-AZA	Yes
	6G	Spontaneous death (37)	CSA-AZA	No
GRMD <sup>MuStem</sup>	7G <sup>Mu</sup>	40	CSA-AZA	Yes
	8G <sup>Mu</sup>	45	CSA-AZA	Yes
	9G <sup>Mu</sup>	Still alive	CSA-AZA	No
	10G <sup>Mu</sup>	Spontaneous death (38)	CSA-AZA	No

**Table 2. Sense and anti-sense primer sequences used for validation of quantitative real-time PCR expression.**

Gene name	Transcript accession	Sense primer (5'-3') sequence	Anti-sense primer (5'-3') sequence	Product size (bp)
ACTC1	XM_535424.4	GGTGGGAATGGGACAGAAGG	TCACGGTTGGCCTTAGGGTT	219
ADIPOQ	NM_001006644.1	GAGATGGCACCCCTGGAGA	CCCCACACTGAATGC CGAAC	182
DEPTOR	XM_539149.4	CAGACCGGGGCATCATTCA	TTGACCCCTTCCTCTTCCT	202
FBXO32	XM_532324.4	GACAAAGGACAGCTGGATTGGA	TCTCCGTACTGCTCTTCCGTG	77
FLRT2	XM_005623720.1	GAGCTGCGAGTGGACGAAAA	AGGTTTGAGAAGGCCGTGAG	275
GATM	XM_544663.4	AAGTGATAGTGGCAGAGCAG	GGGAAAATAGTGGCTCCGTG	119
GPD1	XM_845287.2	AAGGACCAGACCCAAGGAC	AAGGCCCCACAGATCTCCA	104
HFE2	XM_854431.2	TGCTGGGGTTCCTCTTCTCT	CTTCCCTGTCTCTAACCCCT	139
MUSTN1	XM_005642250.1	TCGTACAGCACCCACCATGTC	TTCACACTCCCAGCATGACC	160
NRBF2	XM_005618923.1	GGAAAAGGGCAAAGCGGGA	TGGAAGGGCTGATTTCTCGG	147
PPP1R3B	XM_539996.3	TCGGTGTTCCTACGGTCTGTTC	CTTCCATCTCCACCTGCCT	135
PVALB	XM_003431505.1	CTTTACCGCTGTCGACTCCTT	TCTTGCCATCCCCGTCCTT	239
RPS18	NM_001048082.1	CTAGTGATCCCTGAGAAGTTCC	ATGTCTGCTTTCCTCAATACC	143
SPP1	XM_003434023.2	CCAGCAACCCAATTATCACTCC	GGGAAAGTAGGACGGCATTGAAG	205
ST3GAL5	XM_005630478.1	AGCACAGGTACAGCACGGA	TCTCAAGTGTTCGGGCATGT	164
ZFAND5	XM_005615855.1	AGAGGCAGCAGAATAGTGG	AAACTGATGGACTGGGCTG	279

**Table 3. Comparison with human studies.**

		GRMD <i>versus</i> Healthy	
		Up-regulated	Down-regulated
Chen <i>et al.</i> , 2000	Up-regulated	51 ( $2.9 \times 10^{-20}$ )	1
	Down-regulated	1	8 ( $4.9 \times 10^{-3}$ )
Haslett <i>et al.</i> , 2002	Up-regulated	27 ( $3.6 \times 10^{-21}$ )	0
	Down-regulated	0	3 ( $3.9 \times 10^{-4}$ )
Haslett <i>et al.</i> , 2003	Up-regulated	14 ( $9.4 \times 10^{-7}$ )	0
	Down-regulated	0	0
Pescatori <i>et al.</i> , 2007	Up-regulated	76 ( $2.5 \times 10^{-44}$ )	0
	Down-regulated	0	15 ( $2.3 \times 10^{-11}$ )

The number of genes that are significantly up- or down-regulated in this dog model and in the human study are indicated. These numbers are followed by the corresponding p-value indicated as numbers in parentheses when a significant enrichment is detected.

### 1.1.5 Discussion

La présente étude compare le profil transcriptomique du muscle *Biceps femoris* de chiens sains, de chiens GRMD et de chiens GRMD ayant reçu une administration systémique de cellules MuStem, tous âgés de 9 mois.

A ce jour, une seule étude transcriptomique a été réalisée chez le chien GRMD sur un total de 12 chiens dont 4 sains et 8 dystrophiques, sur trois muscles différents et à deux âges, 4-6 semaines et 6 mois. Elle se focalise sur les mécanismes moléculaires de l'hypertrophie du muscle *Sartorius cranialis* et son implication différente dans le modèle du chien GRMD. L'analyse complète n'est cependant pas publiée et les données ne sont pas déposées dans une base de données accessible (Nghiem et al., 2013). Notre étude constitue la première analyse transcriptomique complète du muscle squelettique de chiens GRMD. Nous rapportons une modification d'expression de 282 gènes dans le muscle de chiens GRMD par rapport au muscle de chien sain. Un enrichissement en termes GO indique que les gènes surexprimés chez les chiens GRMD sont regroupés sous des processus biologiques tels que : la réponse au stress, la réponse aux lipides, la réponse inflammatoire, la régénération, l'adhésion cellulaire, la liaison au calcium, l'organisation de la MEC. Ces résultats sont en accord avec la physiopathologie de la DMD et les données de la littérature puisque les gènes de la réponse inflammatoire, la régénération et l'organisation de la MEC sont largement décrits comme étant surexprimés chez les patients DMD (Baron et al., 2011; Chen et al., 2000; Haslett et al., 2002; Pescatori et al., 2007). Par ailleurs, la dérégulation transcriptionnelle de la voie calcique que nous décrivons concorde avec l'altération du niveau de protéines impliquées dans l'homéostasie calcique décrite chez le chien GRMD par une étude de protéomique quantitative (Guevel et al., 2011). Parmi les gènes sous-exprimés chez le chien GRMD, nous retrouvons de nombreux gènes du métabolisme, notamment impliqués dans les processus d'oxydo-réduction, l'oxydation des acides gras  $\beta$ , la régulation de l'activité des transporteurs membranaires et le métabolisme mitochondrial. La sous-expression de gènes impliqués dans la fonction mitochondriale et le métabolisme énergétique a également été rapportée chez les patients DMD (Chen et al., 2000; Pescatori et al., 2007).

Notre étude moléculaire de la physiopathologie du chien GRMD se base sur la comparaison du profil transcriptomique du muscle des chiens sains par rapport à celui des chiens GRMD et les principales limites sont le faible nombre d'animaux inclus dans l'étude ainsi que le contexte d'immunosuppression. En effet, nous comparons des chiens GRMD

immunosupprimés à des chiens sains qui ne le sont pas, or nous savons qu'un traitement immunosuppresseur peut avoir un impact sur le phénotype des chiens GRMD (Barthélémy et al., 2012; Liu et al., 2004). Certaines voies de signalisation pourraient ainsi être activées ou bien au contraire inhibées sous l'effet des immunosuppresseurs. L'analyse d'enrichissement en termes GO a d'ailleurs montré que le processus biologique « réponse inflammatoire » est enrichi dans la liste des gènes différentiellement exprimés entre les chiens GRMD et sains. Ainsi, sous ce processus biologique pourraient être regroupés un ensemble de gènes spécifiquement dérégulés sous l'effet de l'immunosuppression. Cependant, notre étude est confortée par le fait que parmi les 282 gènes différentiellement exprimés chez les chiens GRMD, 117 ont également été décrits comme étant dérégulés chez les patients DMD et 98% d'entre eux le sont dans le même sens (Chen et al., 2000; Haslett et al., 2003, 2002; Pescatori et al., 2007). De plus, il faut prendre en considération que la majorité des patients DMD sont sous traitement, principalement anti-inflammatoire, et que la comparaison des patients DMD aux sujets sains inclue à la fois le contexte pathologique et le contexte thérapeutique des patients.

Nous montrons une modification d'expression de 31 gènes consécutivement à l'administration systémique de cellules MuStem et il est intéressant de constater qu'ils sont impliqués dans différentes voies moléculaires et cellulaires. L'administration de cellules MuStem est associée à une augmentation d'expression des gènes impliqués dans le processus de la régénération musculaire tels que MUSTN1, SPP1, MYH3/8, DEPTOR et ce résultat est en concordance avec les données histologiques, l'expression diffuse de dystrophine et la stabilisation de l'état clinique des chiens. Une expérience complémentaire pourrait être réalisée par immunohistochimie afin de déterminer si les muscles des chiens GRMD<sup>MuStem</sup> présentent un pourcentage de noyaux Pax7<sup>+</sup> plus important que ceux des chiens GRMD. L'ostéopontine, SPP1, qui est augmentée chez le chien GRMD, l'est encore plus chez le chien GRMD<sup>MuStem</sup>. SPP1 existe à la fois sous forme adhérente à la MEC et sous forme sécrétée (O'Regan and Berman, 2000) et a un rôle très intéressant dans la régénération musculaire (Pagel et al., 2014). L'expression de SPP1 est induite en réponse à une lésion du muscle squelettique et la libération de la protéine SPP1 sur le site de lésion permet la prolifération des myoblastes et l'augmentation de l'infiltration du muscle par les cellules inflammatoires. Les myoblastes eux-même sont une source de SPP1 dans un muscle endommagé et SPP1 sécrétée par les myoblastes permet de contrôler les processus myogéniques et inflammatoires durant les premières phases de la régénération musculaire (Uaesoontrachoon et al., 2008,

2013). Il a été démontré que la prednisolone pouvait augmenter l'expression de SPP1 et nous ne pouvons donc exclure qu'il n'y ait pas d'effet de notre traitement immunosuppresseur sur son expression chez les chiens GRMD, bien que la cyclosporine et l'azathioprine utilisés pour l'immunosuppression ne soient pas des corticostéroïdes comme la prednisolone (Huynh et al., 2013). De manière surprenante, nous montrons que l'administration de cellules MuStem surexprime des gènes de la voie de dégradation des protéines par le complexe ubiquitine-protéasome. Le système UPS (ubiquitin-proteasome system) est important pour le contrôle qualité des protéines et un excès ou un défaut d'activité d'UPS peut avoir un effet néfaste pour l'homéostasie du muscle (Sandri et al., 2013). Nous montrons que, 4 mois après injection des cellules MuStem chez le chien GRMD, le système UPS est activé et nous suggérons que cela favorise l'élimination plus rapide des fragments de protéines et des protéines mal repliées, qui adoptent une mauvaise conformation. Ce phénomène pourrait constituer une première étape transitoire dans le temps nécessaire au processus global de régénération musculaire. Il paraît ainsi intéressant d'aller regarder l'expression de FBXO32 (Atrogin 1), TRIM63 (MURF1), ZFAND5 et MT2A dans le muscle de chiens GRMD<sup>MuStem</sup> plus âgés.

Les 31 cibles que nous avons identifiées par notre approche transcriptomique révèlent que le traitement par thérapie cellulaire MuStem agit, directement ou indirectement, sur différents processus biologiques et différentes voies de signalisation importants pour la régénération musculaire et le remodelage tissulaire. Ces cibles reflètent les modifications moléculaires du muscle *Biceps femoris* de chien GRMD, 4 mois après une administration systémique de cellules MuStem. Les chiens inclus dans la présente étude ont reçu deux injections intra-artérielles et une injection intracardiaque. L'UMR a récemment optimisé le protocole d'injection des cellules MuStem en vue d'une future utilisation clinique. Les nouvelles cohortes de chiens reçoivent les injections de cellules MuStem par voie intraveineuse et présentent de très bons scores cliniques. Il sera intéressant de rechercher l'expression de ces gènes à partir des biopsies de ces nouveaux chiens afin de valider, sur un plus grand nombre de chiens et un autre protocole d'administration systémique, les modifications observées dans cette étude. De plus, il sera intéressant de regarder l'expression de ces gènes plus précocement, peu de temps après l'administration des cellules MuStem, par exemple chez des chiens âgés de 5 mois. Ceci permettrait de dégager les voies de signalisation directement activées dans le muscle suite à l'injection des cellules. La comparaison des niveaux d'expression obtenus pour les cibles à 5 et 9 mois pourrait permettre d'avancer des hypothèses

sur les actions directes et secondaires des cellules MuStem. Il me semble également important de chercher l'expression des 31 gènes dans d'autres muscles que le muscle *Biceps femoris*. Ceci nous permettrait de déterminer si les modifications d'expression génique consécutives à l'administration de cellules MuStem sont identiques dans tous les muscles ou bien si elles varient en fonction de la constitution, de la localisation et de la fonction du muscle. Nous pouvons penser notamment à un muscle respiratoire comme le diaphragme, hautement remanié, qui présente une infiltration inflammatoire et une fibrose importante (Lessa et al., 2014; Mead et al., 2014) ou bien au muscle *Sartorius cranialis* qui est particulièrement hypertrophié chez le chien GRMD à l'inverse des autres muscles (Kornegay et al., 2003; Nghiem et al., 2013).

Nous proposons également notre approche transcriptomique comme une stratégie pouvant permettre d'identifier des biomarqueurs de l'efficacité du traitement. Parmi les 31 gènes dont l'expression est modulée après traitement par thérapie cellulaire MuStem, nous avons recherché lesquels codent des protéines qui peuvent être sécrétées dans l'objectif d'identifier de potentiels biomarqueurs circulants. Cette recherche a été effectuée sur la base de termes GO ("extracellular component") et a permis d'identifier 6 protéines qui peuvent être sécrétées et qui feront l'objet de futures investigations: ADIPOQ, SPP1, PRG4, FLRT2, HFE2, CA2. Nous nous sommes intéressés, en premier lieu, à l'adiponectine (ADIPOQ) qui a montré un rôle protecteur contre le stress oxydatif, le stress inflammatoire et l'apoptose dans le muscle (Jortay et al., 2012) mais également un impact positif sur la survie, prolifération, motilité et différenciation myogénique des cellules satellites et mésoangioblastes (Fiaschi et al., 2009, 2010, 2012). Des premières expériences ont été réalisées par western blot et test Elisa afin de rechercher l'abondance d'ADIPOQ dans le sérum des chiens sains, GRMD et GRMD<sup>MuStem</sup>, à différents âges. Nos résultats préliminaires se montrent encourageants puisque l'abondance d'ADIPOQ diminue dans le sérum des chiens GRMD au cours de l'évolution de la maladie tandis qu'elle augmente très clairement au cours du temps dans le sérum des chiens GRMD<sup>MuStem</sup> pour revenir à un niveau équivalent à celui des chiens sains. Ces résultats doivent cependant être confortés sur un plus grand nombre d'échantillons avant de pouvoir parler de potentiel biomarqueur, et certaines limites sont à discuter. D'une part, nous remarquons que l'augmentation du taux de la protéine dans le sérum est progressive mais surtout visible après 9 mois. Peu de chiens sont gardés en vie jusqu'à ce stade et la plupart des protocoles d'injection de cellules MuStem sont arrêtés à 9 mois afin de permettre l'exploration immunohistochimique des tissus. A ce jour, seuls deux chiens GRMD<sup>MuStem</sup> ont

été suivis à long terme (4 et 5 ans après injection des cellules MuStem). De plus, l'augmentation plutôt tardive d'ADIPOQ au niveau sérique semble être une limite à une éventuelle utilisation en clinique puisqu'un biomarqueur valide devra permettre un contrôle de l'efficacité du traitement le plus rapidement possible après l'injection des cellules MuStem. Les abondances des 5 autres protéines identifiées (SPP1, PRG4, FLRT2, HFE2, CA2) seront également recherchées dans le sérum des chiens sains, GRMD et GRMD<sup>MuStem</sup> dans un futur proche.

De nombreuses analyses sont donc encore à effectuer avant d'obtenir un biomarqueur du traitement par thérapie cellulaire MuStem et un grand nombre d'échantillons biologiques sera nécessaire. On peut toutefois souligner l'intérêt de la réalisation d'analyses « omiques » aussi bien dans l'étude de mécanismes physiopathologiques que dans la recherche de voies de signalisation impliquées en réponse à un traitement.

## 1.2 miRNAs chez le chien GRMD et impact de la transplantation de cellules MuStem

### 1.2.1 Positionnement

Les miRNAs sont de petits ARNs non codants qui régulent l'expression génique à un niveau post-transcriptionnel. Les principaux miRNAs exprimés dans le muscle squelettique sont les myomiRs dont les plus étudiés sont : miR-1, miR-133 et miR-206.

Comme décrit plus en détail dans la partie 3.1.2.3 de l'introduction bibliographique, les miRNAs sont retrouvés dérégulés dans le muscle de patients DMD et chez la souris *mdx*. Il n'existe, à ce jour, aucune donnée relative à l'expression des miRNAs dans le muscle squelettique du chien GRMD, modèle pertinent de la DMD très utilisé pour les études précliniques. Les miRNAs se retrouvent également libérés dans le sérum et les myomiRs sont proposés en tant que biomarqueurs de la pathologie (Cacchiarelli et al., 2011; Mizuno et al., 2011; Zaharieva et al., 2013). Il a été démontré une augmentation des myomiRs dans le sérum des patients DMD et celle-ci peut être corrélée à la sévérité de la pathologie (Cacchiarelli et al., 2011). Les myomiRs circulants apparaissent comme des biomarqueurs de la DMD plus fiables que le taux de CK qui peut varier suite à différents stress.

Dans ce contexte, nous avons recherché, pour la première fois, le niveau d'expression et la localisation tissulaire de miRNAs dans le muscle de chiens GRMD. Notre caractérisation est basée sur 6 miRNAs : miR-1, miR-133, miR-206, miR-222, miR-34, miR-486. Nous avons ensuite étudié l'effet de la thérapie cellulaire MuStem sur les miRNAs au niveau du muscle des chiens GRMD. Pour cela, nous avons comparé les niveaux d'expression des miRNAs obtenus pour les chiens GRMD contrôles (nommés « mock ») et les chiens GRMD<sup>MuStem</sup>, et recherché si le traitement MuStem permet une restauration de l'expression des miRNAs équivalente à celle des chiens sains. Cette partie de l'étude fait l'objet d'une publication en soumission dans le journal « Neuromuscular Disorders ».

Dans l'objectif d'identifier des biomarqueurs circulants potentiels de l'efficacité thérapeutique de la transplantation par les cellules MuStem, nous avons également recherché à explorer les niveaux d'expression des myomiRs dans le sérum des chiens sains, GRMD et GRMD<sup>MuStem</sup> (partie présentée en étude complémentaire).

## 1.2.2 Matériel et méthodes

### 1.2.2.1 Animaux

Un total de 12 chiens âgés de 9 mois a été inclus dans l'étude des miRNAs au niveau tissulaire dont 3 chiens sains et 9 chiens GRMD. Parmi les chiens GRMD, 3 chiens ont été immunosupprimés afin de recevoir des injections de cellules MuStem par voie intraveineuse et correspondent aux chiens GRMD<sup>MuStem</sup>. Trois chiens GRMD contrôles ont été inclus et correspondent à des chiens GRMD immunosupprimés mais n'ayant pas reçu de transplantation cellulaire, nommés « mock GRMD ». Enfin, 3 chiens GRMD n'ont reçu ni traitement immunosuppresseur ni transplantation cellulaire.

### 1.2.2.2 Prélèvements musculaires

Des prélèvements de muscle *Biceps femoris* ont été réalisés après euthanasie des chiens sains, GRMD, mock GRMD et GRMD<sup>MuStem</sup> âgés de 9 mois.

### 1.2.2.3 Extraction des ARNs et qPCR

Les miRNAs ont été extraits des échantillons musculaires avec le kit d'extraction mirVana (Ambion, Austin, TX, USA) puis élués dans un volume final de 100  $\mu$ L d'eau RNase-free. Les transcriptions inverses ont été effectuées à partir de 5 ng de miRNAs et les qPCR ont été réalisées pour miR-1, miR-133, miR-206, miR-222, miR-34 et miR-486, avec des sondes Taqman® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Les données ont été normalisées avec le contrôle interne U6 snRNA et les expressions différentielles ont été calculées par la méthode des  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### 1.2.2.4 Hybridation *in situ*

Afin d'étudier la localisation tissulaire des miRNAs dans les muscles des chiens, des protocoles d'hybridation *in situ* ont été mis au point à l'UMR703 par une ingénieure, Candice Babarit, pour les miR-206 et miR-486.

Les expériences d'hybridation *in situ* ont été réalisées sur des coupes de muscle congelées de 10 $\mu$ m d'épaisseur avec des sondes LNA (pour Locked Nucleic Acid) marquées à la digoxigénine (DIG). La température d'hybridation a été optimisée à 55°C pour les sondes des miR-206 et miR-486. Suite à une incubation avec un anticorps anti-DIG conjugué à l'alcaline phosphatase, la révélation s'effectue par une réaction colorimétrique avec le nitro tetrazolium

et le 5-bromo 5-chloro-3-indolyl phosphate donnant un précipité bleu. Les lames ont été observées et analysées en aveugle.

#### 1.2.2.5 Analyses statistiques

Des comparaisons de moyennes d'expression de miRNAs ont été réalisées entre deux groupes par un test Mann-Whitney. Afin d'analyser simultanément toutes les données, c'est à dire les niveaux d'expression des 6 miRNAs étudiés dans les différents chiens, une analyse en composante principale (ACP) a été effectuée par une biostatisticienne, Chantal Thorin. Les expressions de chaque miRNA constituent les variables actives et les groupes de chiens sont inclus comme facteur supplémentaire. Des ellipses de confiance ont été représentées pour chaque groupe de chiens avec un niveau de confiance de 95%. Notre objectif a été de rechercher si l'on pouvait caractériser les différents groupes de chiens sur la base des niveaux d'expression des 6 miRNAs étudiés.

### 1.2.3 Résumé des résultats

Nous décrivons pour la première fois le profil d'expression de 6 miRNAs, incluant les myomiRs, dans le muscle squelettique de chiens GRMD. Nous montrons une légère diminution de l'expression de miR-1 et miR-133 ainsi qu'une augmentation de l'expression de miR-206 et miR-222 dans le *biceps femoris* des chiens GRMD en comparaison aux chiens sains. Les miR-34 et miR-486, quant à eux, ne montrent pas de modifications d'expression.

Dans un contexte de transplantation allogénique, les chiens GRMD recevant les injections de cellules MuStem et leurs contrôles (« mock GRMD ») ont été immunosupprimés. Afin de déterminer si cette immunosuppression modifie l'expression des miRNAs, nous avons comparé les niveaux d'expression obtenus chez les chiens GRMD et les chiens « mock GRMD ». Nous révélons un impact de l'immunosuppression sur l'expression des miR-206, miR-222 et miR-486, qui se retrouvent plus faiblement exprimés chez les chiens GRMD immunosupprimés par rapport à ceux qui ne le sont pas. En revanche, les niveaux de miR-1, miR-133 et miR-34 sont inchangés sous immunosuppression.

Nous complétons ce travail par la présentation de la localisation cellulaire des miR-206 et miR-486 par une approche d'hybridation *in situ* sur coupe de tissus. Chez les chiens sains, ces deux miRNAs sont exprimés autour de noyaux en périphérie des fibres musculaires et dans des cellules endothéliales. De plus, la majorité des fibres montrent une expression périnucléaire de miR-486. Les chiens GRMD, qu'ils soient immunosupprimés ou non,

présentent la même distribution de miR-206 et miR-486 qui sont principalement exprimés dans les fibres en régénération.

De manière importante, nous montrons que les chiens transplantés par les cellules MuStem présentent des niveaux d'expression des miR-1, miR-133 et miR-486 proches de ceux des chiens sains. Nous révélons ainsi un effet correctif de la thérapie cellulaire MuStem sur l'expression de ces miRNAs. De plus, une ACP, réalisée à partir des données d'expression des 6 miRNAs étudiés, permet de distinguer significativement tous les groupes de chiens (sains, GRMD, mock GRMD, GRMD<sup>MuStem</sup>). Notre approche nous permet ainsi de montrer clairement un effet du phénotype dystrophique, de l'immunosuppression et de la thérapie cellulaire MuStem sur les niveaux d'expression des miRNAs dans le muscle des chiens GRMD.

#### 1.2.4 **Article**

Ce travail fait l'objet d'un manuscrit actuellement soumis dans le journal « Neuromuscular Disorders » (numéro d'identification du manuscrit : NMD-D-14-00356).



## **Muscle microRNA deregulation in Golden Retriever Muscular Dystrophy dogs and impact of MuStem cell transplantation**

Florence Robriquet<sup>a,b,c</sup>, Candice Babarit<sup>a,b</sup>, Thibaut Larcher<sup>a,b</sup>, Mireille Ledevin<sup>a,b</sup>, Héclicia Goubin<sup>a,b</sup>, Chantal Thorin<sup>b,d</sup>, Karl Rouger<sup>a,b,+</sup>, Laëtitia Guével<sup>a,b,c,+</sup>

<sup>a</sup> INRA, UMR703 PAnTher, F-44307 Nantes, France

<sup>b</sup> LUNAM Université, Oniris, École nationale vétérinaire, agro-alimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique, F44-307 Nantes, France

<sup>c</sup> Université de Nantes, F-44322 France

<sup>d</sup> Laboratoire de Physiopathologie Animale et Pharmacologie fonctionnelle, F-44307 Nantes, France

<sup>+</sup> L.G and K.R. shared equal contribution as senior authors.

### **email addresses:**

florence.robriquet@univ-nantes.fr (Florence Robriquet) ; candice.babarit@nantes.inra.fr (Candice Babarit) ; thibaut.larcher@nantes.inra.fr (Thibaut Larcher) ; mireille.ledevin@oniris-nantes.fr (Mireille Ledevin) ; helicia.goubin@oniris-nantes.fr (Helicia Goubin) ; chantal.thorin@oniris-nantes.fr (Chantal Thorin) ; karl.rouger@nantes.inra.fr (Karl Rouger) ; laetitia.guevel@univ-nantes.fr (Laëtitia Guével)

### **Corresponding author:**

Laëtitia GUEVEL, Ph.D.

UMR 703 PAnTher "Physiopathologie Animale et bioThérapie du muscle et du système nerveux"

Oniris - Atlanpôle - La Chantrerie, Route du Gachet

C.S. 40706, F-44307 Nantes Cedex 03, France

laetitia.guevel@univ-nantes.fr

Tel: +33 (0)2 40 68 78 74

Fax: +33 (0)2 40 18 00 02

## Abstract

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a genetic muscle disease that leads to muscle fiber necrosis and progressive muscle weakness. MicroRNAs and more precisely muscle-specific ones (miR-1, miR-133, miR-206) have been identified as being deregulated in skeletal muscle of DMD patients and *mdx* mice. Over the last few years, the Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dog model has been increasingly used to assess efficacy of a wide range of gene- and cell-based therapy approaches. The aim of our study was first to establish the expression patterns of miRNAs in skeletal muscle of the clinically relevant GRMD dog model. Also, we searched to determine whether these expression patterns are affected by immunosuppression and by systemic delivery of the adult muscle-derived stem cells named MuStem cells. A comparative study of the miRNA's expression levels and cellular localization was done in 9-month-old healthy, GRMD, immunosuppressed GRMD and transplanted/immunosuppressed GRMD dogs, using RT-qPCR and *in situ* hybridization. miR-206 and miR-222 are markedly up-regulated in GRMD dog muscles while miR-1 and miR-133 trend toward decreased expression. In parallel, mir-34 and mir-486 remain unchanged. Cyclosporin-based immunosuppressive treatment impacts on three out of six miRNAs (miR-206, miR-222, miR-486) that are specifically down-regulated in the immunosuppressed GRMD dogs. *In situ* hybridization revealed that miR-206 and miR-486 are localized in regenerating muscle fibers. Interestingly, we showed that miRNA patterns of transplanted GRMD dogs are quite similar to that of healthy dogs for miR-1, miR-486 and especially for miR-133, revealing a corrective effect of the MuStem cell transplantation. Overall, we showed that the analysis of a limited set of miRNAs in skeletal muscle clearly discriminate between dystrophic phenotype, immunosuppression context or MuStem cell therapy-related effects on GRMD dogs. This approach represents an interesting tool to monitor therapeutic effect during DMD-dedicated preclinical studies.

## Keywords

miRNA - Duchenne Muscular Dystrophy - GRMD dog model - skeletal muscle - Stem cell therapy - *in situ* hybridization

## 1.Introduction

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a progressive and fatal X-linked recessive disorder of skeletal and cardiac muscles. It is the most severe and common muscular dystrophy, affecting one in 3,500 male at birth [1]. Mutations in the gene encoding the dystrophin lead to a lack of this protein that ensures the essential link between the subsarcolemmal cytoskeleton and the extracellular matrix at the muscle fiber membrane [2,3]. The disease is characterized in particular by fiber necrosis, fibrosis, and progressive muscle weakness, which begins in early childhood [4]. Recently, several gene and cell-based strategies have been set up in order to rescue dystrophin synthesis in the Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dog, the most clinically relevant animal model of DMD, and some of them have now entered preclinical studies [5,6]. In parallel, numerous studies are ongoing to define muscle molecular signature that could be used to characterize the dystrophic dog tissue [7,8] or to validate the effect of therapeutic strategies [9,10].

MicroRNAs (miRNAs) are short non-coding RNA sequences of 21 to 25 nucleotides that regulate gene expression at a post-transcriptional level. Through binding to target mRNA, they promote its degradation or translational inhibition [11,12]. The most studied muscle-specific miRNAs called myomiRs, such as miR-1, miR-133 and miR-206 are involved in regulation of the proliferation or differentiation of myogenic cells [13–16]. They are especially regulated by transcription factors implicated in muscle growth and development [17,18]. Other miRNAs, such as miR-29, miR-34, miR-222 and miR-486, also play key-roles in modulating important pathways of skeletal muscle processes [19–22]. Over the last years, miRNAs have been found to be deregulated in muscular dystrophies [23,24]. Greco *et al.* identified a DMD signature based on eleven miRNAs deregulated both in *mdx* mice and DMD patients [22]. These miRNAs are involved in the pathological pathways activated in skeletal muscle damage and regeneration as a result of dystrophin lack. Concerning myomiRs, several studies report that miR-1 and miR-133 are under-expressed, and that miR-206 is over-expressed in *mdx* muscles [25–27]. Except a preliminary study performed on a *CXMDJ* dog [26], experimental data concerning miRNA status in skeletal muscle of DMD relevant large animal model is currently missing. All these findings show an important role of miRNAs in physiopathological pathways regulating muscle response to damage and regeneration. Moreover, several studies demonstrate that miRNA expression in serum correlates with the disease severity, suggesting their potential use as biomarkers for DMD status [28,29].

Specifically, a recent study identified deregulated miRNAs in the serum of GRMD dogs and DMD patients [30].

In 2011, we have shown that systemic delivery of MuStem cells, muscle-resident stem cells isolated from healthy dog based on delayed adhesion properties, represents an attractive avenue for future therapeutic applications in DMD patients. Indeed, allogeneic MuStem cell transplantation in GRMD dogs led to reduced muscle damage, increased regeneration activity, and a persistent stabilization of clinical status [31].

Herein, we aimed to define the miRNA pattern in the skeletal muscle of GRMD dogs and to determine whether it could be affected by MuStem cell transplantation. Based on deregulation of miR-206, miR-222, miR-1 and miR-133, we describe for the first time a differential expression pattern of miRNAs in GRMD dog muscle at an advanced age of the disease. Using *in situ* hybridization, we show that miR-206 and miR-486 are expressed in newly regenerated fibers. In parallel to this pathological description, we establish that concomitantly to an increased fiber regenerative activity another consequence of MuStem cell transplantation concerns return to physiological levels of three miRNAs. Overall, our results show that a specific muscle miRNA signature defines GRMD dog and investigations of miRNAs in muscle could be useful for the assessment of experimental therapeutic strategies.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Ethic statement and animals*

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Pays de la Loire Region, France, in accordance with the guidelines from the French National Research Council for the Care and Use of Laboratory Animals (Permit Numbers: CEEA.2012.104). All the dogs were obtained from the Centre d'élevage du Domaine des Souches (Mézilles, France) and housed in the Boisbonne Centre for gene and cell therapy of Oniris (Nantes, France). Twelve 9-month-old golden retrievers were included in the study, three of them were healthy dogs and nine were GRMD dogs. Affected dogs were identified in the first week of life thanks to polymerase chain reaction (PCR)-based genotyping. This identification was confirmed with a dramatic and early rise in levels of serum creatine kinase [32]. GRMD dogs were divided in three groups: three dogs receive neither immunosuppressive regimen nor cell transplantation, three others received continuous immunosuppressive regimen (named mock

GRMD) and the three last ones received MuStem cell transplantation under immunosuppression (named GRMD<sup>MuStem</sup>).

### *2.2. Cell delivery procedure*

MuStem cells were isolated from a pool of hindlimb muscles of 2.5-month-old healthy dogs and prepared as previously described (Rouger et al., 2011). Three 3.5 to 4.5-month-old GRMD dogs (GRMD<sup>MuStem</sup>) were submitted to a continuous cyclosporin-based immunosuppressive regimen as established (Rouger et al., 2011) and received three injections in the cephalic vein, spaced out of two weeks, of  $5.5 \times 10^7$  to  $8.0 \times 10^8$  MuStem cells/kg, using laminar flow at a rate of 12 mL/min.

### *2.3. Clinical follow-up*

A clinical score was measured weekly for all GRMD dogs following a previously described method [31,33]. Briefly, the clinical score was established based on 11 locomotion and muscular criteria and 6 items related to the general health status. It was expressed as the percentage of the maximum score defined as 100% for a healthy dog.

### *2.4. Muscle sampling*

*Biceps femoris* muscle samples (0.5 cm<sup>3</sup> fragments) were collected surgically from the middle portion of the muscle in 9-month-old ( $37 \pm 5$ -week-old) healthy, GRMD, mock GRMD and GRMD<sup>MuStem</sup> dogs. This time-point corresponds to four months after the systemic administration to the GRMD<sup>MuStem</sup> dogs. Muscle fragments were snap-frozen in isopentane that was cooled in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until processing.

### *2.5. Histological analysis*

Eight µm-thick cryosections were incubated with mouse primary antibody directed against the myosin heavy chain (MyHCd, 1/20, Novocastra, Newcastle, United Kingdom) for 1 hour at 37°C. After successive incubation with a secondary biotinylated antibody and streptavidin horseradish peroxidase conjugate (1/300, Dako, Glostrup, Denmark), MyHCd protein was visualized by diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Dako). Slides were then

dehydrated and mounted in a dry mounting medium. Morphometric analysis was done using a digital camera (Nikon DXM 1200, Nikon Instruments, Badhoevedorp, The Netherlands) combined with image-analysis software (NIS, Nikon). Microscopic fields were randomly selected on immunolabeled sections using intermediate magnification to observe at least 100 fibers. To determine the percentage of MyHCd<sup>+</sup> fibers, at least 662 fibers (1001 ± 132) were numbered on three randomly selected microscopic fields. For each measurement, reproducibility was above 92%.

### *2.6. RNA isolation and qPCR*

Total RNAs, as well as miRNAs, were extracted from muscle samples using the mirVana miRNA isolation kit (Ambion, Austin, TX, USA) according to the manufacturer's instructions, and finally eluted with 100 µL of water. miRNAs were quantified using Nanodrop spectrophotometer (Labtech, Wilmington Delaware, USA). Reverse Transcription reactions were realized on 5 ng of miRNAs using the TaqMan miRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and miRNA-specific stem loop primers for miR-1, miR-133, miR-206, miR-222, miR-34 and miR-486 (Applied Biosystems miRNA assays). Real-time PCR reactions were performed at least in duplicate with miRNA-specific primers and Taqman® probes on the 7900 HT Real-Time PCR System (Applied Biosystem). Data were normalized using U6 snRNA (RNU6B) as an internal control and differential expression was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method.

### *2.7. In situ hybridization*

*In situ* hybridization was performed in two healthy and three GRMD dogs, using digoxigenin (DIG)-labeled miRCURY locked nucleic acid (LNA) detection probes (Exiqon, Vedbaek, Denmark), corresponding to hsa-miR-486 (38596-05), hsa-miR-206 (88081-15) and scramble-miR (99004-05 and 99004-15). Ten µm-thick frozen muscle sections were air-dried for 1 hour and fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde. Then, they were permeabilized with proteinase K (20 µg/mL) for 10 min. For pre-hybridization, the tissue sections were covered for 1 hour with hybridization buffer containing 50% formamide, 4X SSC, 1X Denhardt's solution, 500 µg/mL salmon sperm DNA (Sigma-Aldrich, MO, USA), 10% dextran sulfate and 1X Blocking Reagent (Roche, Basel, Switzerland). For hybridization, 50 nM of DIG-

labeled probes diluted in hybridization buffer were applied per section and incubated in a sealed humidified chamber for 16 hours at 55°C. Stringency wash was performed for 30 min in 50% formamid/ 1X SSC, followed by two 0.2X SSC washes for 15 min each. Sections were then incubated with alkaline phosphatase-conjugated sheep anti-DIG (1/1000, Roche) antibody for 2 hours. Hybridized probes were visualized by color reaction with nitro tetrazolium (NBT) and 5-bromo 5-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) overnight at 4°C. Slides were counterstained with Nuclear Fast Red and mounting in a Vectamount mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, USA). *In situ* analysis was carried out by one blinded reader and one non-blinded reader with comparable results. No signal was detected using scrambled control probes.

### 2.8. Statistical analyses

For each miRNA, statistical differences between two groups were analyzed by a Mann-Whitney test. In order to analyze simultaneously the expression level of all miRNAs in the different dogs, a Principal Component Analysis (PCA) was also performed. The expression of each miRNA was included as active variable and the dog subset (healthy, GRMD, mock GRMD, GRMD<sup>MuStem</sup>) was included as supplementary factor. In spite of a low sample size, the first plane of PCA summarized 71% of total inertia, allowing its interpretation. A Pearson correlation test was applied to the expression of each miRNA with the two first axis of PCA. A confidence ellipsis was drawn for each dog subset considering a 95% confidence level.

Statistical differences were considered significant if the p-value was less than 0.05. Statistical analyses were performed with R software using Factominer package for the PCA.

## 3. Results

### 3.1. Differential miRNA expression in GRMD dog muscle

To determine whether miRNAs, previously shown to be differentially expressed in skeletal muscle of DMD patients and *mdx* mice, are identically deregulated in the clinically relevant animal model, we investigated the expression levels of six miRNAs in healthy and GRMD dog muscles (n=3 in each group). The generated data were normalized by an internal control RNA frequently used in miRNA expression studies, RNU6B also called U6 snRNA, which gives an average Ct of  $29.26 \pm 0.91$  (SD) in all our samples tested (Fig.S1). Whereas a

tendency towards a decreased expression of miR-1 and miR-133 in GRMD dog muscles compared to healthy ones is noted, an increased expression of miR-206 ( $P = 0.1$ ) and miR-222 ( $P = 0.1$ ) is observed (Fig. 1). On the other hand, miR-34 and miR-486 expression levels are unchanged in GRMD dogs. In the context of allogeneic transplantation protocol, both GRMD dogs receiving MuStem cell injections and mock GRMD dogs were submitted to immunosuppression. In order to determine whether cyclosporin treatment modifies miRNA profile, the expression levels were determined in GRMD dogs with or without immunosuppression. As shown in Fig.1, while no difference is observed for miR-1, miR-133 and miR-34, mock GRMD dogs present lower expression levels of miR-206, miR-222 and miR-486 than GRMD dogs ( $P = 0.1$  for each). These data reveal a selective impact of cyclosporin-based immunosuppressive treatment on the expression levels of some miRNAs, what suggests that this parameter should be considered for the monitoring of each therapeutic study that requires setting up of immunosuppressive context.

### *3.2.miR-206 and miR-486 localization in GRMD dog myofibers*

The cellular localization of miR-206 and miR-486 was assayed by *in situ* hybridization on cryostat muscle sections derived from healthy and GRMD dogs. In healthy dog muscle, miR-206 and miR-486 are expressed around some peripheral nuclei of fibers as well as in endothelial cells (Fig.2). Furthermore, most of the fibers display a perinuclear miR-486 signal. Interestingly, in GRMD dogs, miR-206 and miR-486 are mainly localized in newly formed myoblasts and regenerating fibers as demonstrated by the MyHCd positive labelling on serial sections. Despite the lower expression of miR-206 and miR-486 in muscles of mock GRMD dogs compared to GRMD dogs, the distribution of these two miRNAs remains unchanged.

### *3.3.Modified muscle miRNA expression following MuStem cell transplantation*

The expression level of the six miRNAs previously studied in GRMD dogs was then investigated on three GRMD dogs that received systemic delivery of MuStem cells, in order to determine whether cell transplantation could impact on it. GRMD and mock GRMD dogs display a progressive clinical impairment as characterized by a clinical score of  $52.1\% \pm 17.9$  and  $52.3\% \pm 23.4$  at 9 months of age, respectively. In contrast, all GRMD dogs that received MuStem cells display an early and persistent stabilization of their clinical score that is maintained above  $80.9\% \pm 9.3$  at the same age. Regenerative activity was also assessed on

muscle sections using a specific MyHCd labelling. While  $11.1\% \pm 4.7$  of the fibers express this developmental isoform in mock GRMD dog muscle, the proportion of MyHCd<sup>+</sup> fiber is  $19.2\% \pm 3.2$  in GRMD<sup>MuStem</sup> dogs, demonstrating an increased muscle regenerative activity following MuStem cell delivery.

Concerning miRNA expression levels, we show that miR-1 and miR-34 appear unchanged, while miR-133, miR-206, miR-222, and miR-486 are up-regulated in GRMD<sup>MuStem</sup> dogs as compared to mock GRMD dogs ( $P = 0.1$ ) (Fig.3). Interestingly, we found that, miR-133 and miR-486 expression levels in GRMD<sup>MuStem</sup> dogs are almost similar to the healthy dog ones, suggesting a corrective effect of MuStem cell transplantation. Such effect is particularly substantial for miR-133. In parallel miR-206, which is down-regulated in mock GRMD dogs compared to healthy dogs, is found to be up-regulated after MuStem cell delivery. At last, miR-222 that is up-regulated in mock GRMD dogs appears even more up-regulated in GRMD<sup>MuStem</sup> dogs. To gain global view and determine whether miRNA expression patterns could discriminate dog subsets, a Principal Component Analysis (PCA) was performed (Fig. 4). Importantly, PCA reveals a significant difference between the dog subsets based on the expression profiles of the considered miRNAs, as demonstrated by the disjointed confidence ellipses in Fig. 4B. The expression levels of miR-486, miR-34, miR-1, and miR-133 are significantly lower in mock GRMD subset than in the others due to its significantly negative abscissa. The healthy subset shows lower expression levels of miR-222 and miR-206 than the others, as shown by its significantly negative ordinate. In contrast, the GRMD subset presents higher expression levels for these two miRNAs. Interestingly, we demonstrate that the expression levels of miR-486, miR-34, miR-1, miR-133 are significantly higher in GRMD<sup>MuStem</sup> subset than in mock GRMD one. Also, the expression levels of miR-222 and miR-206 in GRMD<sup>MuStem</sup> subset are characterized by significant intermediate position between GRMD and healthy subsets.

In terms of tissue distribution, the up-regulation determined for miR-206 and miR-486 is not associated with change, *in situ* hybridization done on *Biceps femoris* muscle of GRMD<sup>MuStem</sup> dog revealing an intense expression of both miRNAs on clustered MyHCd<sup>+</sup> regenerative fibers (Fig. S2).

#### 4. Discussion

miRNAs are considered as integral components of the regulatory circuitry for myogenesis even if their complete role in muscle growth and development remains to be elucidated [13–15,18]. Numerous studies demonstrate increasing evidence for miRNA involvement in myopathies and muscular dystrophies [22,23,34]. The aim of the present study was to establish the first description of miRNA deregulations in the GRMD dog skeletal muscle based on a set of miRNAs: miR-1, miR-133, miR-206, miR-222, miR-34 and miR-486. In addition, we aimed to investigate whether a systemic delivery of MuStem cells that increase muscle regeneration and stabilize clinical status of GRMD dogs, can concomitantly restore the miRNA levels.

In accordance with the observations made in the *mdx* mouse model and DMD patients [10,22,25,26], we identified that miR-206 and miR-222 exhibit a marked up-regulation in 9-month-old GRMD dog muscles while miR-1 and miR-133 are slightly down-regulated. The decreased expression of miR-1 and miR-133 is also in accordance with the preliminary results of Yuasa et al. obtained on *Tibialis cranialis* muscle of a *CXMDJ* dog at three different ages [26]. In return, we showed an up-regulation of miR-206 in GRMD dog muscle that contrasts with their results that showed smaller amounts of this miRNA in *CXMDJ* muscles compared to controls [26]. We determined that miR-34 and miR-486 are not deregulated in GRMD dog model while they are respectively described as up-regulated and down-regulated in human and mice dystrophic muscles [22,25,35]. Furthermore, we observed for the first time the miR-206 and miR-486 localization in GRMD dog muscle. Our approach of *in situ* hybridization associated with MyHCd labelling demonstrated that these two miRNAs are related to muscle fiber regenerative process, being identified mainly expressed in newly formed fibers. This distribution was previously reported for miR-206 in *mdx* muscles [10,26] which have considerable regenerative capacity [36,37]. We described here the expression patterns of a miRNA subset, however, further studies need to be conducted in order to understand the implication of miRNAs in the pathophysiology of GRMD dog.

We highlighted that cyclosporin-based immunosuppressive regimen decreases miR-206, miR-222 and miR-486 expression in mock GRMD dogs. It is established that cyclosporin A, the principal component of our immunosuppressive regimen, can delay muscle regeneration [38,39]: this could explain why miR-206, the well-known regenerative miRNA, is down-regulated in immunosuppressed GRMD dogs. Pre-clinical trials targeting DMD, currently

performed on GRMD dog model, used in many cases an immunosuppressive treatment [40]. Given our results, we want to put forward that all studies involving miRNA analyses should consider the immunosuppressive context and use the appropriate controls. Recently, it has been reported that miRNAs are promising biomarkers for noninvasive monitoring of disease progression and response to experimental therapies [28–30]. Our observations, pointing at the influence of immunosuppressive treatment on miRNA levels in muscle tissue, have important implications for using serum miRNAs as therapeutic biomarker.

We have previously shown that a systemic delivery of MuStem cells in GRMD dogs led to a limitation of muscle damage with an increased regeneration activity and a persistent stabilization of clinical status [31]. In this study, we investigated the expression levels and cellular localization of a set of miRNAs in treated GRMD dog muscles that displayed higher proportion of MyHCd<sup>+</sup> fibers than GRMD dogs, reflecting active fiber regeneration. Alexander *et al.* have shown that overexpression of miRNA-486 can result in a beneficial effect on dystrophin-defective muscle [41]. In this way, miRNA might offer a therapeutic strategy for delaying or mitigating the disease progression. In accordance with this statement, we found a corrective effect of MuStem cell transplantation on miR-133 and miR-486 expression levels. On the other side, MuStem cells increased miR-206 levels in GRMD dogs and this is directly correlated with an intense regeneration assessed by the elevated number of MyHCd<sup>+</sup> fibers.

Our Principal Component Analysis, based on the expression of a set of 6 miRNAs, allowed us to clearly discriminate dystrophic phenotype, immunosuppression context or MuStem cell therapy effect on GRMD dogs. Quantification of miRNA expression level might allow to monitor therapeutic effect on preclinical studies using GRMD dog model.

### **List of abbreviations**

DMD, Duchenne Muscular Dystrophy; GRMD, Golden Retriever Muscular Dystrophy; GRMD<sup>MuStem</sup>, GRMD dogs transplanted with MuStem cells; miRNAs, microRNAs

**Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests.

### **Author's contributions:**

FR designed and performed miRNA quantification experiments, drafted the manuscript and prepared figures. CB designed and carried out *in situ* hybridization, drafted the manuscript and prepared figures. TL performed clinical follow-up of the dogs, tissue sampling and described *in situ* hybridization experiments. ML and HG performed tissue sampling, immunohistochemistry experiments and morphometry analysis. CT performed the Principal Component Analysis. KR and LG designed the set of experiments, analyzed data and critically revised the manuscript. All authors contributed to the final draft of manuscript.

### **Acknowledgements:**

Authors would like to thank the staff of the Boisbonne Centre (Oniris, Nantes, France) for the handling and care of the GRMD dog colony and Pr. JY Deschamps for the clinical surgery; I. Leroux and C. Schleder for the MuStem cell isolation; A. Lardenois for helpful discussions; C. Le Guiner for providing some GRMD muscle samples. This research was supported by the grants from the Association Française contre les Myopathies (AFM N°14379) and the FEDER (Fonds Européen de Développement Régional N°37085). It was carried out in the context of the IHU-Cesti project that received French government financial support managed by the National Research Agency via the investment of the future programme ANR-10-IBHU-005. The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire Region.

### **References**

- [1] Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul Disord* 1991;1:19–29.
- [2] 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;54:447–52.
- [3] Cooper BJ, Winand NJ, Stedman H, Valentine BA, Hoffman EP, Kunkel LM, et al. The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature* 1988;334:154–6.
- [4] Dubowitz V. Neuromuscular disorders in childhood. Old dogmas, new concepts. *Arch Dis Child* 1975;50:335–46.

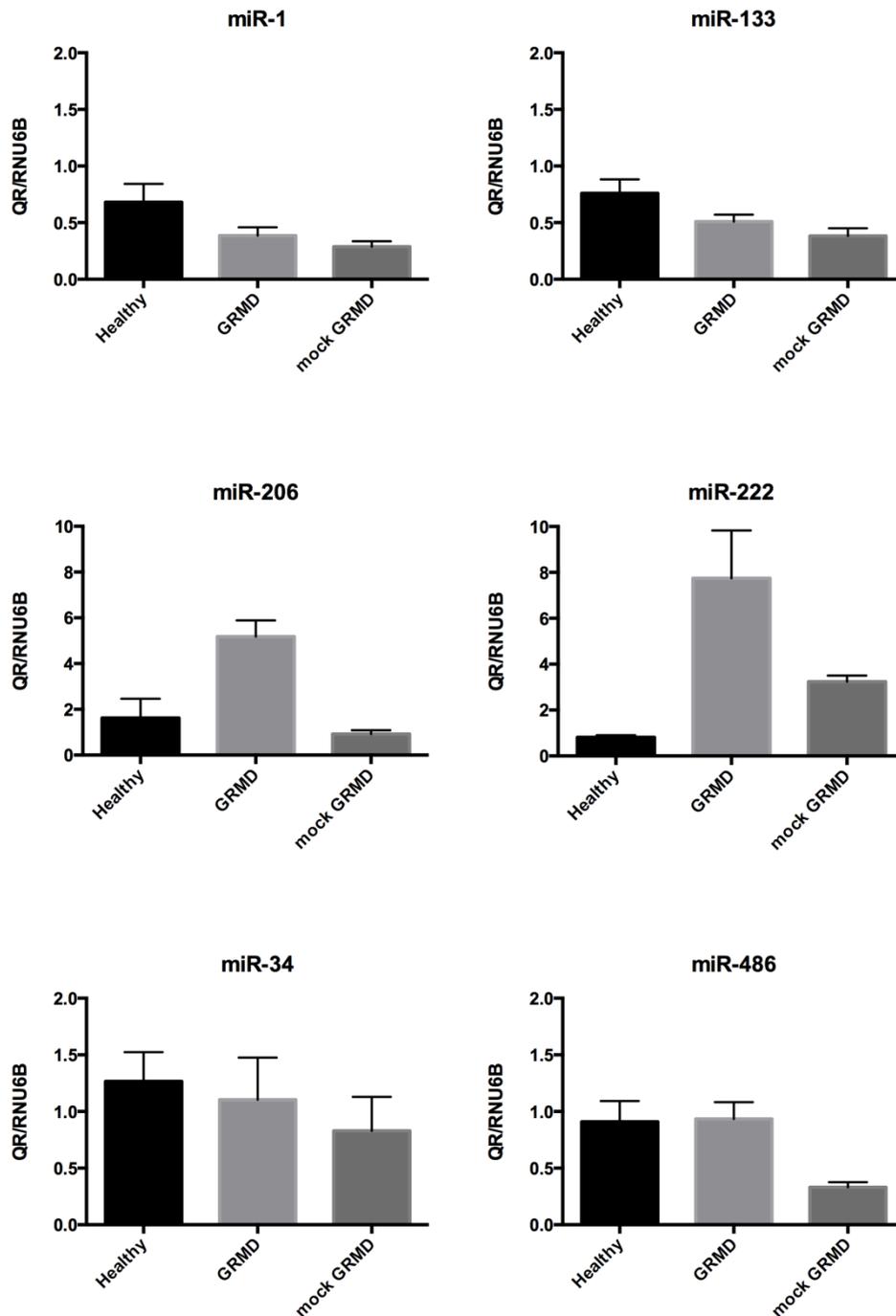
- [5] Pichavant C, Aartsma-Rus A, Clemens PR, Davies KE, Dickson G, Takeda S, et al. Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD. *Mol Ther* 2011;19:830–40.
- [6] Kornegay JN, Bogan JR, Bogan DJ, Childers MK, Li J, Nghiem P, et al. Canine models of Duchenne muscular dystrophy and their use in therapeutic strategies. *Mamm Genome* 2012;23:85–108.
- [7] Guevel L, Lavoie JR, Perez-Iratxeta C, Rouger K, Dubreil L, Feron M, et al. Quantitative proteomic analysis of dystrophic dog muscle. *J Proteome Res* 2011;10:2465–78.
- [8] Nghiem PP, Hoffman EP, Mittal P, Brown KJ, Schatzberg SJ, Ghimbovski S, et al. Sparing of the dystrophin-deficient cranial sartorius muscle is associated with classical and novel hypertrophy pathways in GRMD dogs. *Am J Pathol* 2013;183:1411–24.
- [9] Doran P, Wilton SD, Fletcher S, Ohlendieck K. Proteomic profiling of antisense-induced exon skipping reveals reversal of pathobiochemical abnormalities in dystrophic mdx diaphragm. *Proteomics* 2009;9:671–85.
- [10] Cacchiarelli D, Martone J, Girardi E, Cesana M, Incitti T, Morlando M, et al. MicroRNAs involved in molecular circuitries relevant for the Duchenne muscular dystrophy pathogenesis are controlled by the dystrophin/nNOS pathway. *Cell Metab* 2010;12:341–51.
- [11] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000;403:901–6.
- [12] Chen K, Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat Rev Genet* 2007;8:93–103.
- [13] Goljanek-Whysall K, Pais H, Rathjen T, Sweetman D, Dalmay T, Münsterberg A. Regulation of multiple target genes by miR-1 and miR-206 is pivotal for C2C12 myoblast differentiation. *J Cell Sci* 2012;125:3590–600.
- [14] Kim HK, Lee YS, Sivaprasad U, Malhotra A, Dutta A. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J Cell Biol* 2006;174:677–87.
- [15] Chen J-F, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 2006;38:228–33.
- [16] Chen J-F, Tao Y, Li J, Deng Z, Yan Z, Xiao X, et al. microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J Cell Biol* 2010;190:867–79.
- [17] Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, Baskerville S, Lodish HF. Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:8721–6.
- [18] Liu N, Williams AH, Kim Y, McAnally J, Bezprozvannaya S, Sutherland LB, et al. An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:20844–9.
- [19] Wei W, He H-B, Zhang W-Y, Zhang H-X, Bai J-B, Liu H-Z, et al. miR-29 targets Akt3 to reduce proliferation and facilitate differentiation of myoblasts in skeletal muscle development. *Cell Death Dis* 2013;4:e668.

- [20] Cardinali B, Castellani L, Fasanaro P, Basso A, Alemà S, Martelli F, et al. MicroRNA-221 and microRNA-222 modulate differentiation and maturation of skeletal muscle cells. *PLoS One* 2009;4:e7607.
- [21] Dey BK, Gagan J, Dutta A. miR-206 and -486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7. *Mol Cell Biol* 2011;31:203–14.
- [22] Greco S, De Simone M, Colussi C, Zaccagnini G, Fasanaro P, Pescatori M, et al. Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. *FASEB J* 2009;23:3335–46.
- [23] Eisenberg I, Alexander MS, Kunkel LM. miRNAs in normal and diseased skeletal muscle. *J Cell Mol Med* 2009;13:2–11.
- [24] Erriquez D, Perini G, Ferlini A. Non-coding RNAs in muscle dystrophies. *Int J Mol Sci* 2013;14:19681–704.
- [25] Roberts TC, Blomberg KEM, McClorey G, El Andaloussi S, Godfrey C, Betts C, et al. Expression analysis in multiple muscle groups and serum reveals complexity in the microRNA transcriptome of the mdx mouse with implications for therapy. *Mol Ther Nucleic Acids* 2012;1:e39.
- [26] Yuasa K, Hagiwara Y, Ando M, Nakamura A, Takeda S, Hijikata T. MicroRNA-206 is highly expressed in newly formed muscle fibers: implications regarding potential for muscle regeneration and maturation in muscular dystrophy. *Cell Struct Funct* 2008;33:163–9.
- [27] McCarthy JJ, Esser K a, Andrade FH. MicroRNA-206 is overexpressed in the diaphragm but not the hindlimb muscle of mdx mouse. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;293:C451–7.
- [28] Cacchiarelli D, Legnini I, Martone J, Cazzella V, D'Amico A, Bertini E, et al. miRNAs as serum biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol Med* 2011;3:258–65.
- [29] Zaharieva IT, Calissano M, Scoto M, Preston M, Cirak S, Feng L, et al. Dystromirs as serum biomarkers for monitoring the disease severity in duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 2013;8:e80263.
- [30] Jeanson-Leh L, Lameth J, Krimi S, Buisset J, Amor F, Le Guiner C, et al. Serum Profiling Identifies Novel Muscle miRNA and Cardiomyopathy-Related miRNA Biomarkers in Golden Retriever Muscular Dystrophy Dogs and Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *Am J Pathol* 2014.
- [31] Rouger K, Larcher T, Dubreil L, Deschamps J-Y, Le Guiner C, Jouvion G, et al. Systemic delivery of allogenic muscle stem cells induces long-term muscle repair and clinical efficacy in duchenne muscular dystrophy dogs. *Am J Pathol* 2011;179:2501–18.
- [32] Honeyman K, Carville KS, Howell JM, Fletcher S, Wilton SD. Development of a snapback method of single-strand conformation polymorphism analysis for genotyping Golden Retrievers for the X-linked muscular dystrophy allele. *Am J Vet Res* 1999;60:734–7.
- [33] Thibaud J-L, Monnet A, Bertoldi D, Barthélémy I, Blot S, Carlier PG. Characterization of dystrophic muscle in golden retriever muscular dystrophy dogs by nuclear magnetic resonance imaging. *Neuromuscul Disord* 2007;17:575–84.

- [34] Eisenberg I, Eran A, Nishino I, Moggio M, Lamperti C, Amato AA, et al. Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:17016–21.
- [35] Alexander MS, Casar JC, Motohashi N, Myers J a, Eisenberg I, Gonzalez RT, et al. Regulation of DMD pathology by an ankyrin-encoded miRNA. *Skelet Muscle* 2011;1:27.
- [36] Coulton GR, Curtin NA, Morgan JE, Partridge TA. The mdx mouse skeletal muscle myopathy: II. Contractile properties. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1988;14:299–314.
- [37] Tanabe Y, Esaki K, Nomura T. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. *Acta Neuropathol* 1986;69:91–5.
- [38] Stupka N, Gregorevic P, Plant DR, Lynch GS. The calcineurin signal transduction pathway is essential for successful muscle regeneration in mdx dystrophic mice. *Acta Neuropathol* 2004;107:299–310.
- [39] Sakuma K, Nakao R, Aoi W, Inashima S, Fujikawa T, Hirata M, et al. Cyclosporin A treatment upregulates Id1 and Smad3 expression and delays skeletal muscle regeneration. *Acta Neuropathol* 2005;110:269–80.
- [40] Barthélémy I, Uriarte A, Drougard C, Unterfinger Y, Thibaud J-L, Blot S. Effects of an immunosuppressive treatment in the GRMD dog model of Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 2012;7:e48478.
- [41] Alexander MS, Casar JC, Motohashi N, Vieira NM, Eisenberg I, Marshall JL, et al. MicroRNA-486-dependent modulation of DOCK3/PTEN/AKT signaling pathways improves muscular dystrophy-associated symptoms. *J Clin Invest* 2014;124:2651–67.



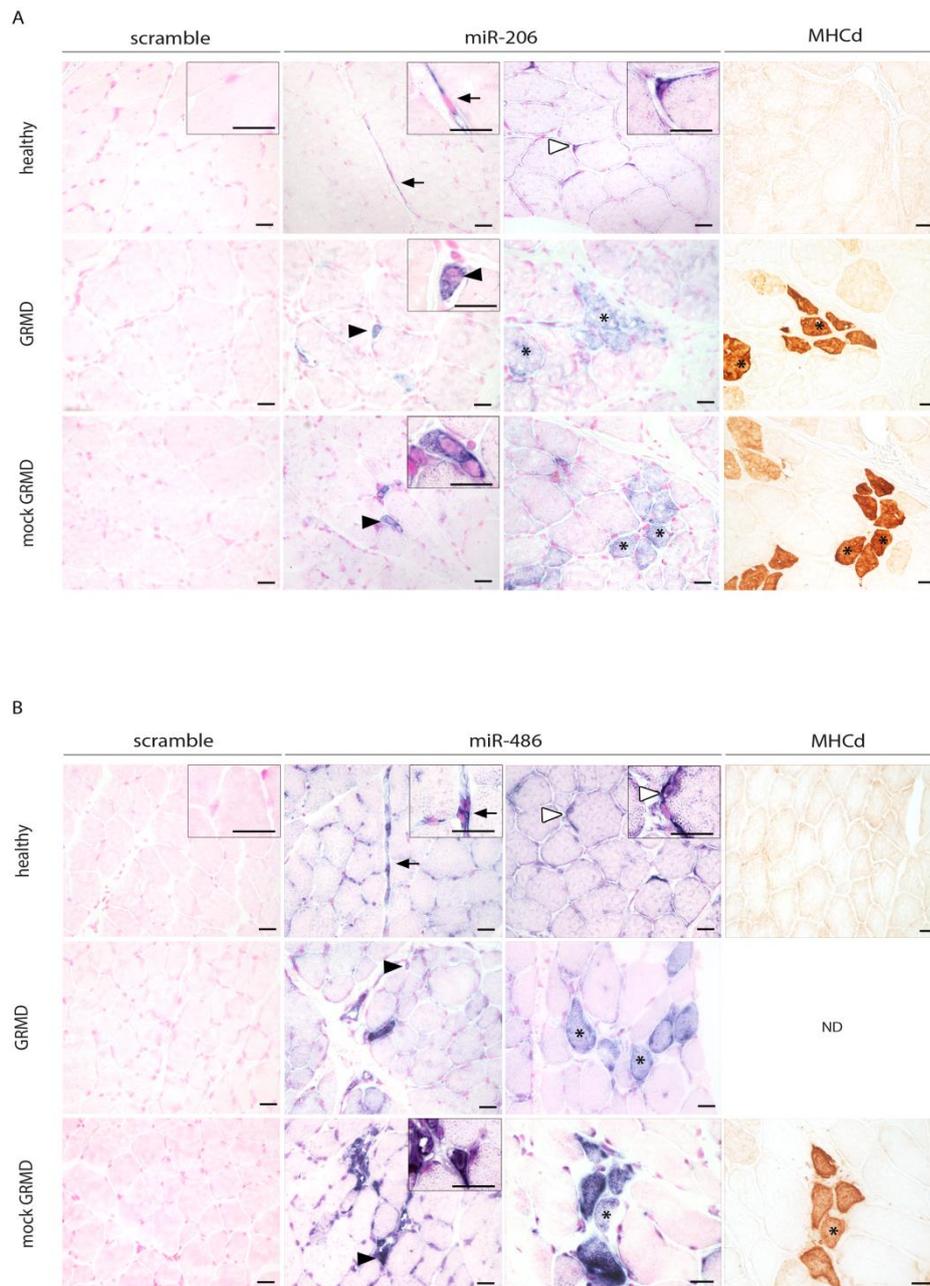
## Figures



**Fig. 1. The relative expression levels of miRNAs in dog muscle.**

Expression levels of miR-1, miR-133, miR-206, miR-222, miR-34, and miR-486 were determined in 9-month-old healthy, GRMD and mock GRMD dog muscles by real-time PCR and were normalized by RNU6B levels. Results are indicated as relative expression and are presented as mean  $\pm$  SEM, n=3 in each group.

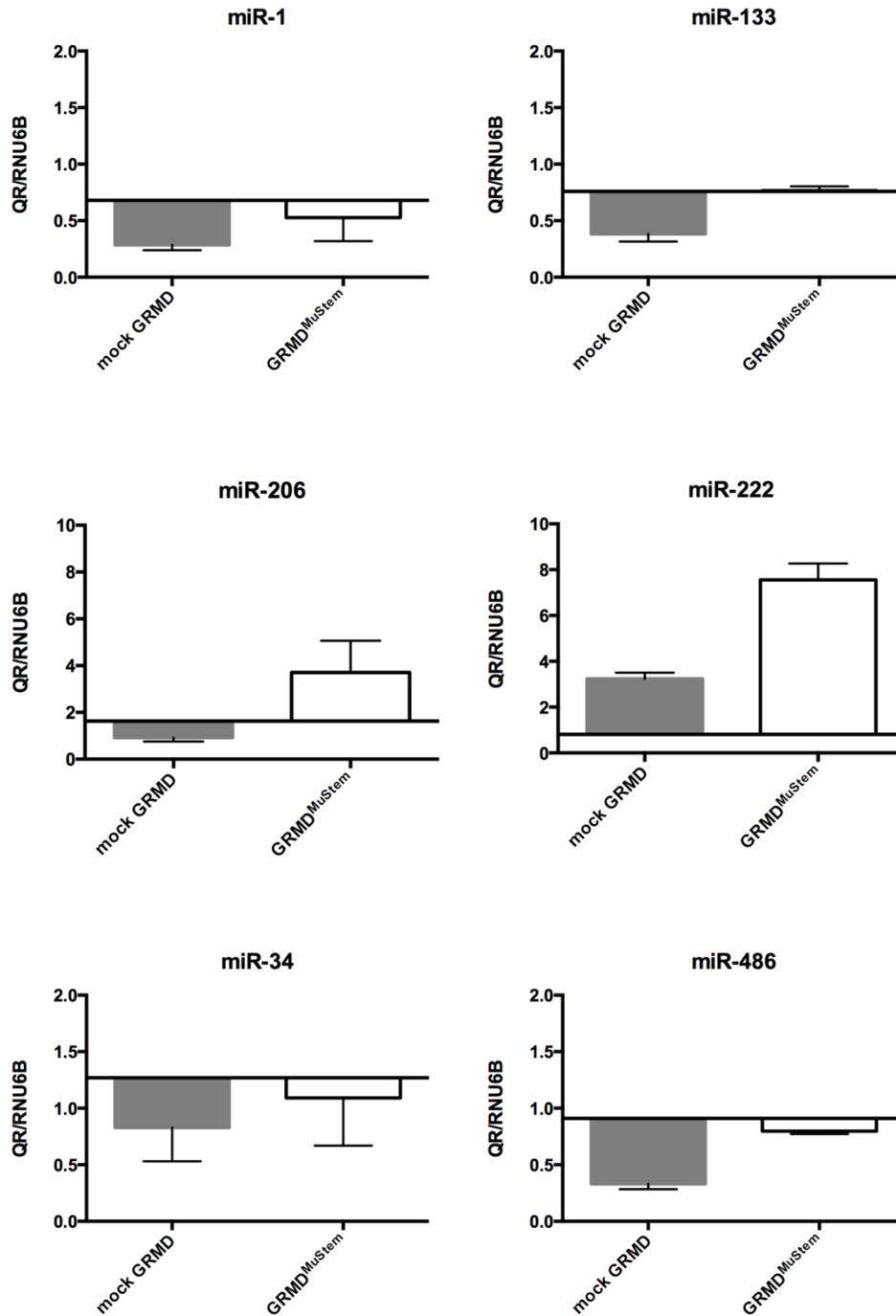




**Fig. 2. miR-206 and miR-486 localization in healthy and GRMD dog skeletal muscle.**

The tissue localization of miR-206 and miR-486 was assayed by *in situ* hybridization on cryostat *Biceps femoris* muscle sections derived from healthy and GRMD dogs, using digoxigenin labelled LNA probes. Representative images are shown. **(A) miR-206 expression.** In healthy dog (upper panel), miR-206 expression is detected in cytoplasmic processes of vessel endothelial cells (black arrow) and around some peripheral nuclei (empty arrow head) of muscle fibers. In GRMD (middle panel) and mock GRMD dogs (lower panel), a strong signal is detected in myoblasts (black arrow head) and regenerating fibers positive for MyHCd (asterisk). **(B) miR-486 expression.** In healthy dog (upper panel), miR-486 is detected both in endothelial cells (black arrow) and around peripheral nuclei (empty arrow head). In GRMD (middle panel) and mock GRMD dogs (lower panel), miR-486 is localized in myoblasts (black arrow head) and regenerating fibers (asterisk). The correlation between MyHCd and miR-486 was not done (ND) for the GRMD dog. Calibration bar, 25  $\mu$ m.

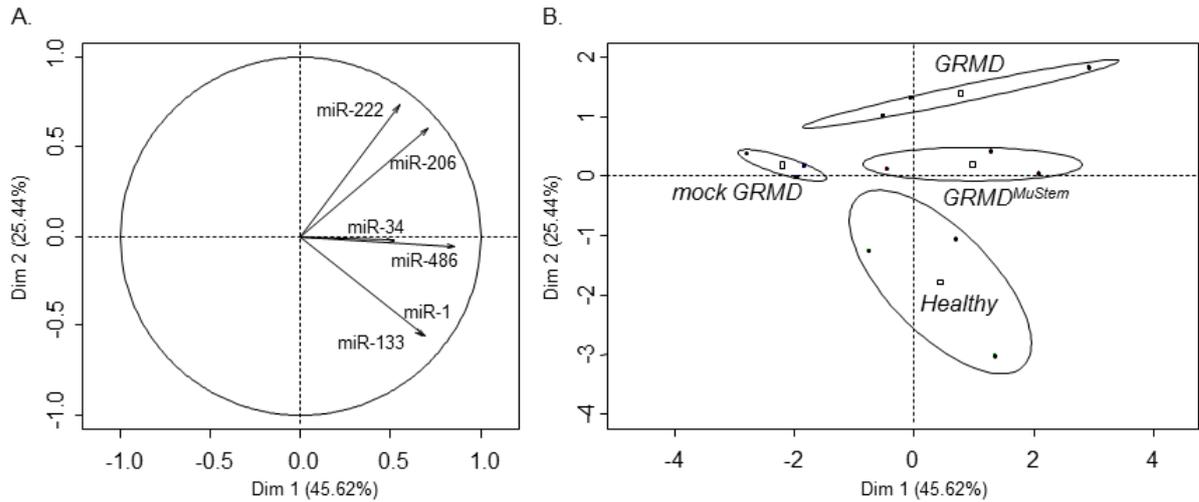




**Fig. 3. Modulation of miRNA levels in GRMD dog muscles after systemic administration of MuStem cells.**

Expression levels of miR-1, miR-133, miR-206, miR-222, miR-34, and miR-486 were determined in 9-month-old GRMD<sup>MuStem</sup> dog muscles and compared to mock GRMD dogs ones. RNU6B was used as internal control and relative expressions are presented as mean  $\pm$  SEM, n=3 in each group. The baseline is determined at the mean of expression levels in healthy dogs in order to determine easily a corrective effect.

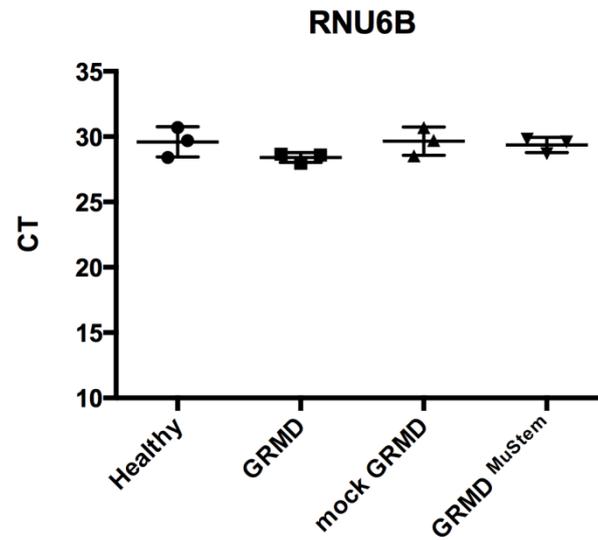




**Fig. 4. First factorial plane of PCA.**

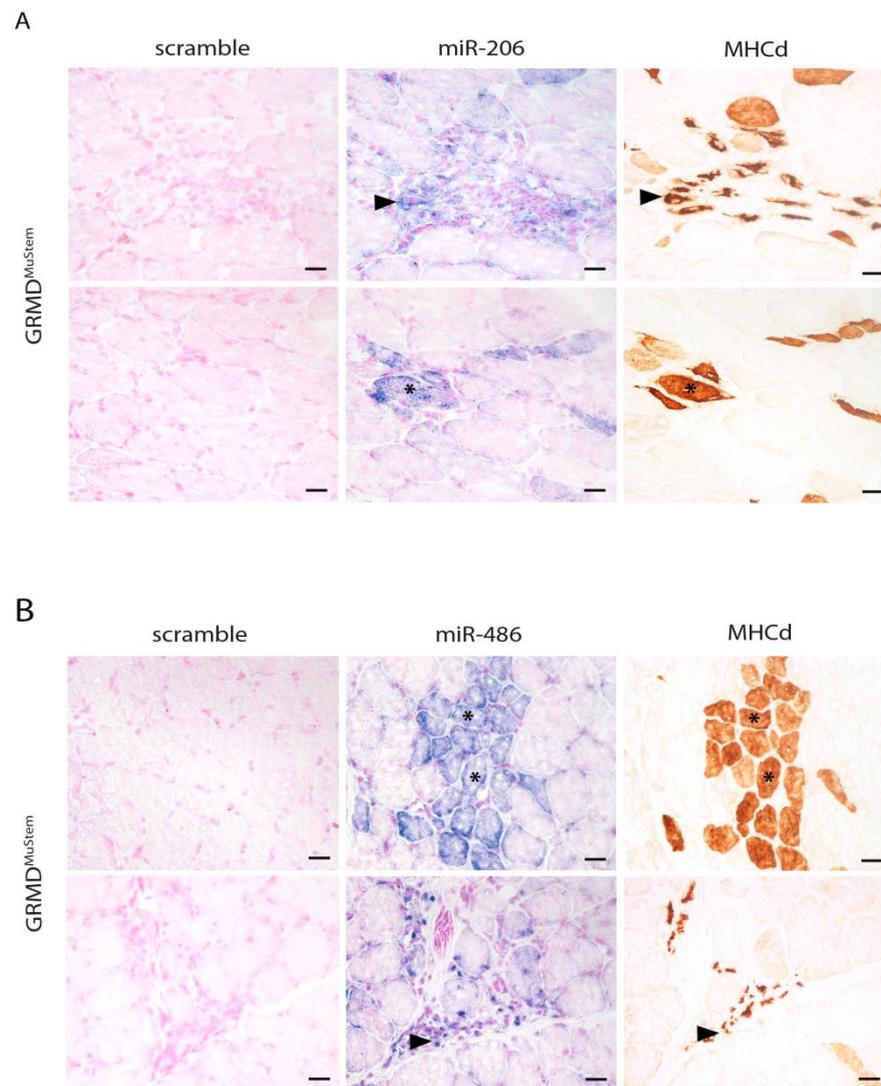
**(A) Variable factor map.** The circle of correlation between two first axes of PCA and original variables allows the interpretation of the map. Abscissas of the first factorial plane are significantly positively correlated with the expression levels of miR-486 ( $p < 0.0001$ ), miR-34 ( $p > 0.05$ ), miR-1 ( $p = 0.0133$ ), miR-133 ( $p = 0.016$ ) while ordinates are significantly positively correlated with miR-222 ( $p = 0.0066$ ) and miR-206 ( $p = 0.0392$ ). All miRNA expression levels are positively correlated between themselves **(B) Individual factor map.** The projection of each dog on the first plane of PCA and 95% confidence ellipsis for dog subsets are represented. In the half plane with positive abscissas, we find dogs with high expression levels of all miRNAs. In return, in the half plane with negative abscissas, we find dogs with low expression levels of miRNAs.

## Supplemental figures



**Fig. S1. Validation of RNU6B as an internal control for miRNAs expression study in dog muscles.**

The threshold cycle (CT) of RNU6B was determined in each sample and shows similar levels between healthy, GRMD, mock GRMD and GRMD<sup>MuStem</sup> dogs.



**Fig. S2. miRNA localization in GRMD dog muscle after MuStem cell transplantation.**  
**(A) miR-206 expression. (B) miR-486 expression.** miR-206 and miR-486 are detected in myoblasts (empty arrow head) and in the cytoplasm of small and intermediate regenerating fibers (asterisk). Calibration bar, 25  $\mu$ m.



### 1.2.5 Etude complémentaire : miRNAs circulants

En parallèle de l'étude des miRNAs tissulaires chez le chien GRMD, nous nous sommes intéressés aux miRNAs circulants. L'objectif a été de rechercher si les niveaux d'expression des myomiRs sériques varient chez le chien GRMD après transplantation avec les cellules MuStem. L'étude des miRNAs dans le sérum des chiens s'est effectuée en collaboration avec l'équipe de Laurence Jeanson (Généthon, Evry) qui m'a accueillie sur une période de deux semaines afin de réaliser les expériences.

Nous avons analysé le niveau d'expression des myomiRs miR-1, miR-133 et miR-206 dans le sérum des chiens âgés de 9 mois. Les expériences préliminaires ont été réalisées sur 6 chiens sains, 4 chiens « mock » GRMD et 5 chiens GRMD<sup>MuStem</sup> des premières cohortes ayant reçu des injections intra-artérielles de cellules MuStem (à la différence des chiens inclus dans l'article miRNA qui correspondent aux chiens du nouveau protocole d'injection, par voie intraveineuse).

#### 1.2.5.1 Matériel et Méthodes

##### A. Préparation des sérums

Le sang des chiens a été prélevé par la veine céphalique et collecté dans des tubes sans traitement anticoagulant. Les tubes ont été laissés 4H à 4°C avant d'être centrifugés (3000 g, 10 min). Le surnageant correspondant au sérum a été prélevé puis stocké à -80°C.

##### B. Extraction des ARNs

L'extraction des miRNAs a été réalisée avec le kit miRNeasy (Qiagen) à partir de 250 µL de sérum de chien. Les ARNs ont été élués dans 100 µL d'eau RNase-free. Ils sont ensuite précipités sur la nuit et resuspendus dans 10 µL d'eau RNase-free afin de les concentrer. Les ARNs sont alors quantifiés avec le spectrophotomètre Nanodrop (Labtech) et leur qualité est analysée avec les puces « Small RNA kit » et « Pico RNA kit » par le bioanalyseur 2100 (Agilent).

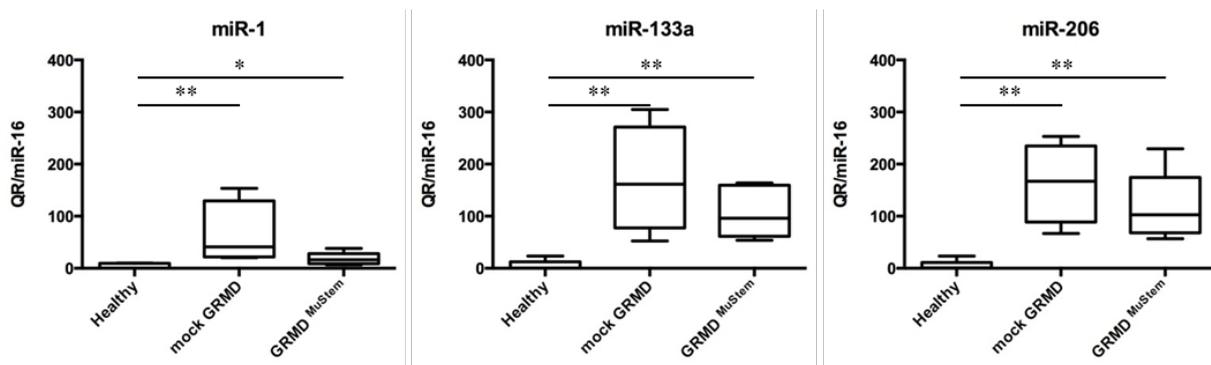
##### C. qPCR

Les ARNs (10 ng) sont convertis en ADNc à l'aide d'amorces spécifiques des miRNAs qui font partis des kits « Applied Biosystem miRNA assay ». Les ADNc sont dilués 4 fois et les qPCR sont réalisées avec des amorces spécifiques et des sondes Taqman sur l'appareil 7900HT (Applied Biosystems). Les Ct (Cycle threshold), permettant la quantification, sont

déterminés avec le logiciel SDS v2.3 en utilisant une ligne de base automatique et un seuil fixé à 0,2 à partir duquel sont déterminés les Ct. Les résultats de qPCR sont exprimés en Ct avec des Ct  $\leq 35$  et normalisés par rapport à miR-16. Les expressions différentielles sont calculées par la méthode des  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### 1.2.5.2 Résultats

Nos résultats démontrent que le niveau d'expression des myomiRs est significativement plus élevé chez les chiens « mock » GRMD que chez les chiens sains (Figure 19). Il est également significativement plus élevé chez les chiens GRMD<sup>MuStem</sup> que chez les chiens sains. Nos premiers résultats ne nous permettent pas de conclure à une différence significative entre les chiens « mock » GRMD et les chiens GRMD<sup>MuStem</sup>. Cependant, nous notons une tendance à la diminution du miR-1 dans le sérum des chiens GRMD<sup>MuStem</sup>.



**Figure 19 Niveaux d'expression des myomiRs dans le sérum de chiens GRMD et GRMD<sup>MuStem</sup> en comparaison aux chiens sains.**

Les niveaux d'expression des miR-1, -133 et -206 ont été recherchés dans les sérums des chiens sains (n=6), GRMD « mock » (n=4) et GRMD<sup>MuStem</sup> injectés par voie intra-artérielle (n=5). Des tests statistiques Mann-Whitney ont été réalisés et \* ou \*\* correspondent à p<0,05 et p<0,01 respectivement.

### 1.2.6 Discussion

L'objectif de l'étude était d'établir, pour la première fois, le profil d'expression de miRNAs dans le muscle du chien GRMD qui constitue le modèle cliniquement pertinent de la DMD. Cette caractérisation a été établie sur la base de 6 miRNAs (miR-1, miR-133, miR-206, miR-222, miR-34 et miR-486) identifiés comme étant dérégulés chez la souris *mdx* et dans le muscle de patients DMD (Cacchiarelli et al., 2010; Greco et al., 2009; Roberts et al., 2012; Yuasa et al., 2008). Nous montrons que le muscle de chiens GRMD surexprime miR-206 et miR-222 alors qu'il présente une plus faible expression des miR-1 et miR-133 par rapport aux chiens sains. Ces variations s'avèrent identiques à celles observées dans le modèle de la souris *mdx* et chez les patients DMD.

Dans le cadre d'études précliniques réalisées chez le chien dystrophique, les transplantations allogéniques nécessitent souvent d'avoir recours à une immunosuppression (Dell'Agnola et al., 2004; Rouger et al., 2011; Sampaolesi et al., 2006). Nous avons recherché si le traitement immunosuppresseur à base de cyclosporine A de notre protocole pouvait moduler l'expression des miRNAs dans le muscle des chiens GRMD. Nous montrons que ce type d'immunosuppression diminue l'expression de miR-206, miR-222 et miR-486. Ces résultats nous démontrent que les données générées à partir de différentes cohortes doivent être analysées avec prudence en tenant compte du contexte immunosuppresseur. Nous soulevons l'intérêt d'utiliser les contrôles appropriés pour chaque étude.

Nous montrons, par hybridation *in situ*, la localisation cellulaire de miR-206 et miR-486 dans le muscle de chiens. Les chiens GRMD, immunosupprimés ou non, expriment ces deux miRNAs principalement dans les fibres en régénération, positives pour la myosine développementale. Ce même profil d'expression a été décrit chez la souris *mdx*. Il pourrait être intéressant de rechercher par immunohistochimie les cibles de ces miRs, notamment Pax7 et PTEN pour miR-206 et miR-486 respectivement (Alexander et al., 2011, 2014; Small et al., 2010). Phénotyper les fibres qui expriment miR-206 et miR-486 pourrait apporter des éléments de compréhension sur l'implication de ces deux miRs dans les mécanismes physiopathologiques du chien GRMD.

Alors que la thérapie cellulaire MuStem ne modifie pas la localisation des miR-206 et miR-486 dans le muscle des chiens GRMD, elle permet de ramener l'expression de miR-133 des chiens GRMD à un niveau équivalent à celui des chiens sains. Etant donné cet effet correctif majeur, il nous paraît intéressant de rechercher la localisation de ce miRNA dans le

muscle des chiens par hybridation *in situ*. Cela nous permettrait de définir si cette modification d'expression se traduit également par une distribution différente du miR-133.

De manière intéressante, l'analyse de nos résultats par ACP nous permet de distinguer statistiquement les différents groupes de chiens (sains, GRMD, mock GRMD, GRMD<sup>MuStem</sup>) d'après les niveaux d'expression des 6 miRNAs étudiés. Cette approche nous permet donc d'identifier à la fois un phénotype dystrophique, un contexte d'immunosuppression et l'effet de la transplantation des cellules MuStem.

Suite à ces résultats prometteurs, nous envisageons maintenant de rechercher l'expression des mêmes miRNAs dans le sérum des chiens GRMD<sup>MuStem</sup> de cette cohorte, qui ont reçu des injections intraveineuses de cellules MuStem. L'objectif serait de rechercher si l'effet correctif observé sur les miR-1, miR-133 et miR-486 au niveau tissulaire se traduit de la même manière au niveau sérique. Cela ouvre ainsi des perspectives quant à l'identification de miRNAs circulants pouvant permettre de suivre l'efficacité thérapeutique de la transplantation avec les cellules MuStem.

## **Chapitre 2. Cellules MuStem : définition de l'agent humain et capacités de réponse aux changements environnementaux**

### **2.1 Caractérisation des cellules MuStem humaines**

#### **2.1.1 Positionnement**

Un protocole expérimental adapté de celui utilisé pour l'isolement des cellules MuStem canines a permis d'identifier, à partir de prélèvements de muscle de patients ne présentant pas de pathologie musculaire, une population de cellules non adhérentes. Sur la base de ces résultats, l'UMR a engagé il y a plus de trois ans un vaste programme de qualification de ces cellules MuStem humaines afin de déterminer si elles peuvent ou non être présentées comme produit thérapeutique pour la mise en place d'un essai clinique chez les patients atteints de DMD. Les premiers résultats ont permis d'établir que les cellules humaines partagent différentes caractéristiques avec les cellules MuStem canines : une capacité de prolifération élevée, des modalités de division atypiques avec la formation de cellules fusiformes et des cellules rondes, une oligopotence. Le potentiel myogénique pour ces cellules MuStem humaines a été montré *in vitro* par la formation de myotubes.

L'un des objectifs de ma thèse a été de participer à cette caractérisation des cellules souches MuStem humaines en complétant leur profil phénotypique. Les cellules MuStem présentant une forte capacité de prolifération et une oligopotence, je me suis plus particulièrement intéressée au caractère primitif de ces cellules. J'ai recherché l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la pluripotence et l'auto-renouvellement des cellules souches, que sont Klf4, Nanog, Oct3-4, Sox2. Ces marqueurs, initialement décrits dans les cellules ES, sont désormais retrouvés présents dans bon nombre de cellules souches adultes. J'ai ensuite recherché l'expression de facteurs de régulation myogénique (MRFs) que sont Pax7, Myf5, MyoD, MyoG afin de situer les cellules MuStem dans le programme myogénique.

## 2.1.2 Matériel et méthodes

### 2.1.2.1 Différents types cellulaires

Les cellules MuStem humaines et les myoblastes sont isolés à partir de prélèvements de muscles paravertébraux, correspondant à des déchets opératoires d'enfants de 12 à 15 ans atteints de scoliose aïgue, obtenus au CHU de Nantes. Récupérés au bloc chirurgical, les prélèvements sont immédiatement placés à 4°C dans une solution de PBS (Phosphate Buffered Saline) contenant 2% d'un mélange d'antibiotiques et d'antifongiques (PSF, Sigma-Aldrich, MO, USA) et transportés à l'UMR pour l'isolement cellulaire. Le protocole d'isolement et d'amplification des cellules MuStem fait actuellement l'objet d'un dépôt de brevet, raison pour laquelle celui-ci ne sera pas détaillé dans ce rapport.

Les cellules MuStem sont cultivées en milieu d'amplification correspondant à un milieu de grade clinique supplémenté de SVF, bFGF, EGF et PSF. Les myoblastes sont cultivés dans un milieu composé de : HAMF12, 15% SVF, 1,25 ng/mL bFGF (Miltenyi Biotec, Germany) et 1% PSF (Eurobio, France).

Des cellules pluripotentes induites (iPS) dérivées de fibroblastes humains, fournies par l'équipe de Christian Pinset (I-Stem, Evry, France), ont été cultivées afin d'être utilisées comme contrôle positif des marqueurs de pluripotence. Les iPS sont cultivées sur des supports de culture coâtés avec du matrigel (BD biosciences, CA, USA) dans le milieu mTesR1 (Stemcell Technologies, Grenoble, France). Elles sontensemencées à une densité de 20000 cellules/cm<sup>2</sup> en présence de 10 µM de Rock inhibitor Y-27632 (Stemcell Technologies). Ces cellules iPS ont été utilisées comme contrôle positif des marqueurs de pluripotence.

### 2.1.2.2 Extraction des ARNs totaux et transcription inverse (RT)

Les ARNs totaux ont été extraits à partir de culots secs de 2 à 3.10<sup>6</sup> de cellules MuStem à passage 5 (P5), de myoblastes et de cellules iPS avec le RNeasy mini kit (Qiagen, Santa Clara, CA, USA) selon les instructions du fournisseur. Les ARN totaux ont été quantifiés avec le spectrophotomètre Nanodrop (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) et chaque échantillon a été traité à la DNase Ambion (Life technologies, CA, USA). Des ARNs de cellules embryonnaires (ES) fournis par I-Stem (équipe de Christian Pinset, Evry) ont également été utilisés en tant que témoin positif pour cette étude. Les RT ont été réalisées sur

0,5 µg d'ARN avec la GoScript reverse transcriptase (Promega, Madison, USA) dans un volume final de 20 µL.

### 2.1.2.3 PCR et q-PCR en temps réel

Les amorces utilisées, indiquées dans le tableau 1, ont été définies avec le logiciel Oligo Primer Analysis Software v.7 (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, USA) et synthétisées par Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). Elles ont été modélisées avec des conditions stringentes afin de pouvoir les utiliser en PCR et qPCR.

	Nom du gène	Séquence des amorces (5'-3')		Produit (pb)	Numéro d'accèsion
Gène de Référence	RPS18	For	ACC AAG AGG GCG GGA GAA	85	NM_022551.2
		Rev	CTG GGA TCT TGT ACT GGC GTC		
Gènes de pluripotence	KLF4	For	AGA GGA GCC CAA GCC AAA GA	181	NM_004235.4
		Rev	TTT CCA TCC ACA GCC GTC CCA G		
	NANOG	For	AGA AGA GTG TCG CAA AAA AGG AAG	261	NM_024865.2
		Rev	TCT GCG TCA CAC CAT TGC TAT T		
	OCT3-4	For	CAG CGA CTA TGC ACA ACG AGA	151	NM_002701.4
		Rev	GAA AGG GAC CGA GGA GTA CAG		
SOX2	For	ATG CAC CGC TAC GAC GTG A	150	NM_003106.3	
	Rev	GGA CTT GAC CAC CGA ACC CAT			
Gènes de facteurs de régulation myogénique	PAX7	For	GGA GGA CGA CGG CGA AAA GAA	216	NM_002584.2
		Rev	TCG CGG GTG TAT ATG TCT GGG		
	MYF5	For	CCA CGA CCA ACC CCA ACC A	122	NM_005593.2
		Rev	TCC CGG CAG GCT ATA GTA GT		
	MYOD	For	TGG TTT GGA TTG CTC GAC GTG	123	NM_002478.4
		Rev	CCC TAC AGA TGC CCA CAA CC		
	MYOG	For	CCC TAC AGA TGC CCA CAA CC	126	NM_002479.4
		Rev	GAT GCC CGG CTT GGA AGA C		

**Tableau 1 Liste des amorces utilisées pour les RT-PCR et qPCR en temps réel**

Le numéro d'accèsion GenBank et la taille des amplicons en paires de bases (pb) obtenus pour chaque gène sont indiqués.

Les réactions de PCR ont été réalisées avec 0,5 µL d'ADNc sur l'appareil Labcycler Gradient (SensoQuest) selon le programme suivant : une phase initiale de dénaturation (12 min, 95°C) suivie de 35 cycles (30 sec, 94°C ; 30 sec, 60°C ; 30 sec, 72°C) puis une phase finale d'extension (10 min, 72°C). Les produits de PCR ont été déposés sur un gel d'agarose 2% auquel un intercalant de l'ADN a été ajouté, le GelRed (Biotium, Hayward, CA), dans du tampon TAE 0,5X. Suite à la migration, les amplicons sont visualisés.

Les réactions de qPCR en temps réel ont été effectuées en triplicat sur les produits de RT dilués au 1:20<sup>ème</sup> avec le kit qPCR MESA BLUE (Eurogentec, Seraing, Belgium). Elles ont

été réalisées sur l'appareil Thermocycler CFX96 (Biorad, California, USA) avec les paramètres suivants : 5 min à 95 °C suivi de 15 sec à 95 °C et 1 min at 60 °C par cycle, pour un total de 40 cycles. Le gène RPS18 a été utilisé comme gène de référence et les niveaux d'expression relative ont été calculés par la méthode des  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

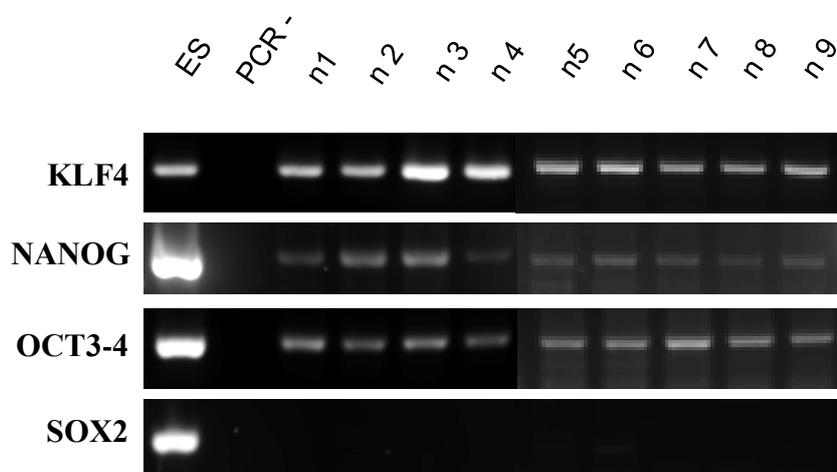
#### 2.1.2.4 Immunocytochimie

Les cellules MuStem ont étéensemencées entre P5 et P7 dans des chambres de culture Lab-Tek (Nalge-Nunc, Rochester, NY, USA) préalablement gélatinées à une densité de  $2.10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> dans leur milieu de prolifération pendant 3 jours. Des cellules iPS dérivées de fibroblastes humains ont été utilisées comme contrôle positif des marqueurs de pluripotence. Les iPS ont étéensemencées dans des chambres de culture Lab-Tek coatées avec du matrigel dans le milieu mTesR1 (Stemcell Technologies). Du Rock inhibitor Y-27632 (Stemcell Technologies) a été ajouté après le passage des cellules à une concentration de 10 µM. Après avoir retiré le milieu des puits et effectué un lavage avec du PBS tiédi, les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde à 2% dans du PBS (pH 7.4) à température ambiante (TA) pendant 10 minutes. La perméabilisation a été réalisée avec 0,3% de triton X-100 (20 min, 4°C) et la saturation avec du sérum de chèvre à 5% dans du PBS (60 min, TA). Les cellules ont ensuite été incubées sur la nuit à 4°C avec les anticorps de lapin anti-KLF4, NANOG, OCT-4A, tous dilués au 1:100 et fournis par Cell Signaling Technology (MA, USA). Un anticorps secondaire biotinylé (1:300, polyclonal de chèvre, Dako, Glostrup, Denmark) permettant une amplification du signal a été ajouté (60 min, TA) puis complété par de la streptavidine conjuguée à de l'Alexa 555 (60 min, TA, à l'obscurité ; 1:2000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Une contre-coloration au DRAQ5 (1:1000, Biostatus, Loughborough, UK) a permis de marquer les noyaux (15 min, 37°C). Les comptages ont été réalisés sur plus de 300 cellules.

## 2.1.3 Présentation des résultats

### 2.1.3.1 Expression de marqueurs de pluripotence

L'expression des marqueurs de pluripotence et d'auto-renouvellement Klf4, Nanog, Oct3-4, Sox2 a été recherchée dans les cellules MuStem humaines par RT-PCR (n=9) (Figure 20). Les cellules ES qui expriment ces quatre facteurs de transcription ont été utilisées comme témoin positif. Nous retrouvons la présence des transcrits Klf4, Nanog et Oct3-4 pour tous les lots de cellules MuStem testés. En revanche, les cellules MuStem n'expriment pas le facteur de transcription Sox2.



**Figure 20 Expression des marqueurs de pluripotence et d'auto-renouvellement par RT-PCR**

Les RT-PCR ont été réalisées sur 9 lots de cellules MuStem humaines (n1 à n9). Les cellules embryonnaires (ES) ont été utilisées comme témoin positif. Le contrôle négatif a été réalisé avec de l'eau RNase-free.

La bande PCR obtenue pour Klf4 étant d'intensité similaire voir supérieure à celle obtenue pour les cellules ES, l'expression de Klf4 a été quantifiée dans les cellules MuStem par RT-qPCR et comparée à celle des cellules ES (Figure 21). Les cellules MuStem expriment Klf4 à un cycle seuil Ct moyen de  $24,2 \pm 0,9$  (n1 à n9) alors que les cellules ES l'expriment à un Ct de 24,1. Il est intéressant de constater que cinq lots de cellules MuStem sur neuf testés présentent une expression relative de Klf4 supérieure à celle des cellules ES (Figure 21).

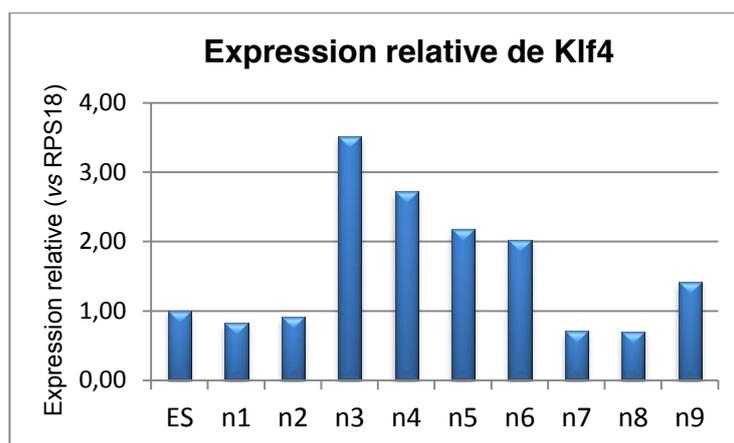


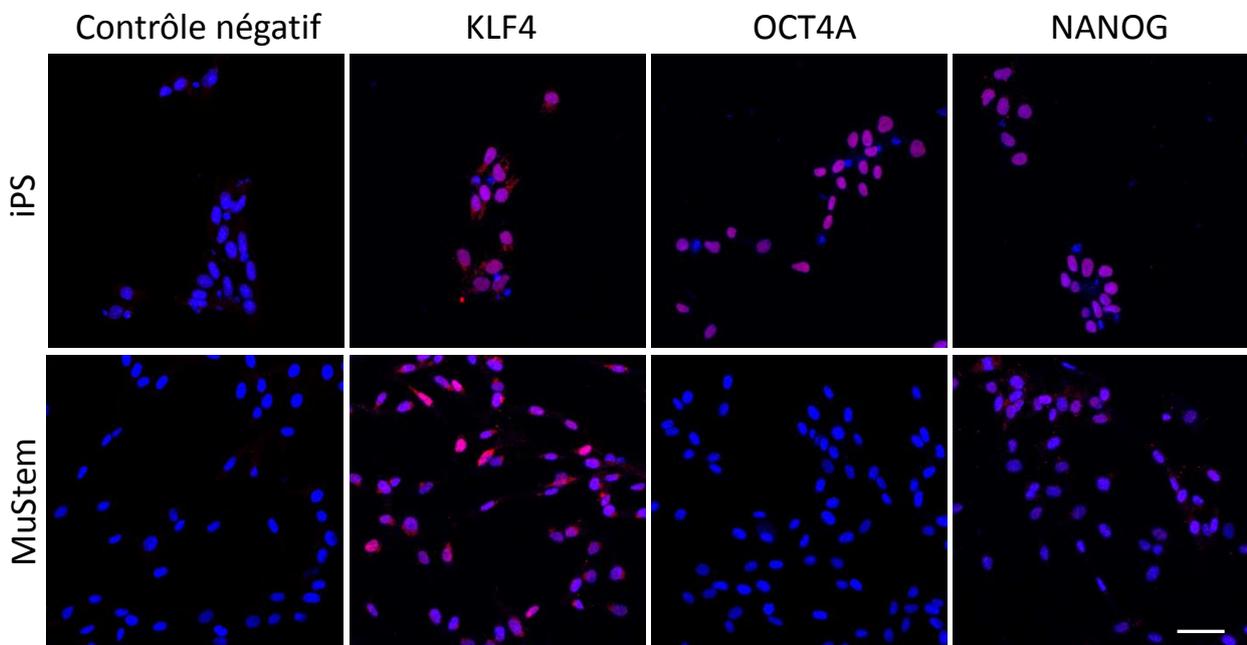
Figure 21 **Expression relative du facteur de transcription Klf4 par RT-qPCR**

L'expression relative de Klf4 par rapport aux cellules ES a été recherchée par RT-qPCR sur 9 lots de cellules MuStem humaines (n1 à n9). La normalisation des données a été réalisée avec le contrôle interne RPS18.

L'expression de Nanog et Oct 3-4 et a également été quantifiée dans les cellules MuStem (n1 à n9) par RT-qPCR. Les cellules MuStem expriment Nanog à un Ct moyen de  $28,1 \pm 0,9$  et Oct 3-4 à un Ct moyen de  $29,0 \pm 0,6$ . Les cellules MuStem expriment beaucoup plus faiblement Nanog et Oct 3-4 que les cellules ES qui présentent un Ct de 20,1 pour Nanog et de 19,8 pour Oct 3-4.

Les gènes Klf4, Nanog et Oct 3-4 étant exprimés dans les cellules MuStem, nous avons recherché la présence des protéines correspondantes par immunocytochimie. L'objectif était alors de savoir si ces gènes sont fortement exprimés dans seulement quelques cellules ou bien s'ils sont exprimés par l'ensemble des cellules MuStem. Les cellules iPS, transduites avec ces facteurs de pluripotence, sont utilisées comme témoin positif. La Figure 22 montre des clichés représentatifs des marquages obtenus. Les comptages réalisés sur 9 lots cellulaires nous permettent de démontrer que  $96,1 \pm 2,8$  % des cellules MuStem sont KLF4<sup>+</sup>,  $93,5 \pm 5,4$ % sont NANOG<sup>+</sup> et quelques très rares cellules sont OCT4A<sup>+</sup>. Les résultats d'immunocytochimie sont donc en accord avec les résultats de RT-PCR et qPCR obtenus pour Klf4 et Nanog. La grande majorité des cellules MuStem expriment le transcrite de ces deux gènes et présentent également la protéine. Concernant Oct3-4, il faut savoir que les amorces utilisées pour les RT-PCR et qPCR s'alignent avec tous les variants (1 à 5) et ne sont pas spécifiques du variant 1 correspondant à Oct4A responsable de la forme embryonnaire. Ceci pourrait expliquer le fait que nous retrouvions le transcrite Oct3-4 exprimé par les cellules MuStem mais pas la présence de la protéine OCT4A. Nous ne pouvons cependant exclure que les quelques très rares cellules OCT4A<sup>+</sup> soient à l'origine des transcrits retrouvés,

bien qu'il semble peu probable qu'elles puissent expliquer un Ct moyen de 29. Nous pouvons également penser que les cellules MuStem expriment le transcrit du variant 1 de Oct3-4 mais que des répressions empêchent la traduction protéique.

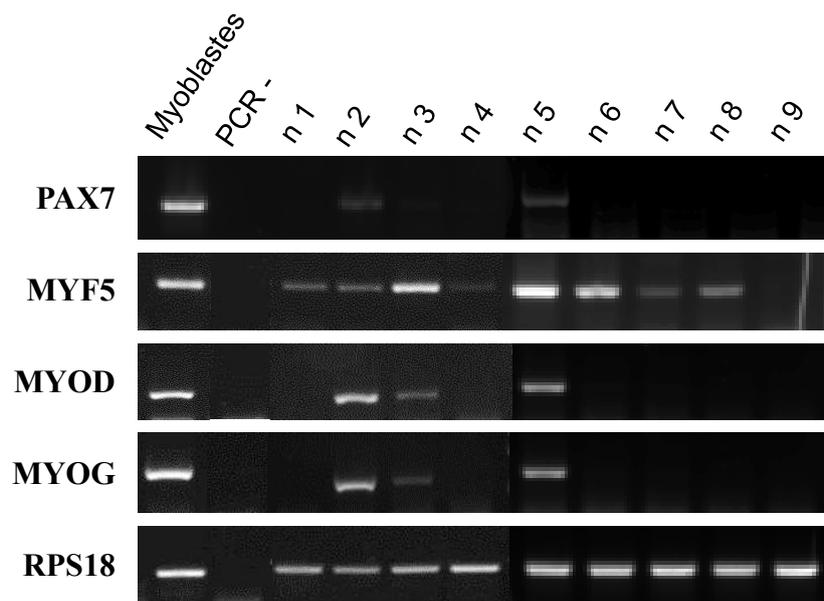


**Figure 22 Immunomarquage des marqueurs de pluripotence et d'auto-renouvellement**

Les immunocytochimies ont été réalisées pour les facteurs KLF4, OCT4A et NANOG sur 9 lots de cellules MuStem humaines. Les cellules iPS ont été utilisées comme témoin positif et les contrôles négatifs ont été réalisés sans les anticorps primaires. La barre d'échelle représente 50  $\mu$ m.

### 2.1.3.2 Expression des facteurs de régulation myogéniques

L'expression des facteurs de transcription et de régulation myogénique Pax7, Myf5, MyoD et MyoG a été recherchée dans les cellules MuStem par RT-PCR (n1 à n9) (Figure 23). Les cellules myoblastes qui les expriment constituent notre témoin positif. Pax7 est exprimé dans deux lots de cellules MuStem sur 9 testés tandis que Myf5 est exprimé dans la plupart des lots de cellules MuStem. MyoD et MyoG présentent une hétérogénéité d'expression selon les lots de cellules MuStem et ils sont exprimés tous deux dans les mêmes lots (n2, n3 et n5). Les cellules MuStem présentent donc une hétérogénéité d'expression des MRFs au niveau transcriptionnel, et certains lots, comme n2, n3 et n5, semblent plus engagés dans le programme myogénique bien que ceci devra être confirmé au niveau protéique.



**Figure 23 Expression des facteurs de régulation myogénique par RT-PCR**

Les RT-PCR ont été réalisées sur 9 lots de cellules MuStem humaines pour Pax7, Myf5, MyoD, MyoG et RPS18, le gène de référence. Les cellules myoblastes ont été utilisées comme témoin positif. Les PCR négatives ont été réalisées avec de l'eau RNase-free.

#### 2.1.4 Discussion

Les facteurs de transcription Oct3-4, Sox2, Nanog et Klf4 sont des marqueurs de pluripotence et d'auto-renouvellement initialement décrits dans les cellules ES et sont depuis utilisés pour générer les cellules pluripotentes induites nommées iPS (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007; Wernig et al., 2007). De nombreuses études ont démontré que l'expression de ces facteurs de transcription n'est désormais plus restreinte aux cellules ES et que les cellules souches adultes sont capables de les exprimer à des degrés différents et avec des combinaisons de facteurs différentes (Indumathi et al., 2013; Riekstina et al., 2009). Une étude a notamment comparé le profil d'expression des marqueurs dits « des cellules ES » dans les cellules humaines CSM isolées de la moelle osseuse, du tissu adipeux, du cœur et du derme (Riekstina et al., 2009). Les résultats ont montré que toutes les CSM, dérivées de ces quatre tissus, expriment Oct3-4 et Nanog et que seules les CSM de la moelle osseuse n'expriment pas Sox2. Oct3-4 et Nanog permettent notamment de maintenir la prolifération et le potentiel de différenciation des CSM tout en inhibant leur différenciation spontanée, via l'augmentation d'expression de Dnmt1 qui participe à la méthylation de l'ADN (Tsai et al., 2012b). Wei *et al.* démontrent par ailleurs que des cellules humaines dérivées du muscle squelettique, correspondant à des cellules progénitrices isolées à partir de myosphères formées en culture, expriment Oct3-4, Nanog et Sox2, par RT-PCR (Wei et al., 2011).

Nos résultats, obtenus à la fois par RT-PCR et qPCR, démontrent que les cellules MuStem expriment les gènes Klf4, Nanog et Oct3-4 mais n'expriment pas Sox2. Nous montrons également la présence des protéines KLF4 et NANOG dans la grande majorité des cellules MuStem (à plus de 90%). Nous ne retrouvons cependant pas l'isoforme OCT4A dans les cellules MuStem. Il existe en effet deux isoformes majeures de la protéine OCT4, OCT4A et OCT4B, issues de l'épissage alternatif d'un même gène et qui diffèrent dans leurs fonctions (Lee et al., 2006). Seul le variant 1 du transcrit Oct3-4 possède le premier exon et est capable de donner lieu à l'isoforme OCT4A qui possède le domaine de transactivation N-terminal qui régule la liaison de OCT4A à ses promoteurs cibles (Jez et al., 2014). C'est la forme OCT4A qui permet de maintenir l'auto-renouvellement et l'état indifférencié des cellules ES. La forme OCT4B est principalement localisée dans le cytoplasme et ne peut pas activer la transcription des gènes cibles (Lee et al., 2006). D'après nos résultats, les cellules MuStem ne traduisent pas l'isoforme OCT4A mais présentent tout de même des transcrits Oct3-4. Les amorces utilisées dans nos expériences de RT-qPCR ne nous permettent pas de distinguer les

différents variants de transcrit Oct3-4. Afin de déterminer si le transcrit correspondant à l'isoforme OCT4A est présent, il faudrait modéliser de nouvelles amorces qui soient spécifiques à la région 5' de l'ARNm Oct4A.

De manière intéressante, nous démontrons que les cellules MuStem humaines expriment Klf4 à un niveau équivalent, voir supérieur pour certains lots, à celui des cellules ES. Ce facteur de transcription, exprimé dans de nombreux tissus adultes et plus particulièrement dans les cellules épithéliales, a un rôle clé dans la détermination du devenir cellulaire (Vangapandu and Ai, 2009). Une étude comparative du profil d'expression génique de CSM dérivées de la moelle osseuse et du tissu adipeux a permis d'identifier le rôle central de KLF4 par l'enrichissement de séquences de liaison à Klf4 dans le promoteur des gènes fortement exprimés dans les CSM (Saulnier et al., 2011). Klf4 régule ainsi l'activité transcriptionnelle des CSM et permet également de maintenir l'état souche des cellules en diminuant leurs différenciations spontanées (Saulnier et al., 2011). Klf4 agit aussi sur l'activité télomérase des cellules souches en activant l'expression de hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) et permet ainsi de maintenir le potentiel prolifératif des cellules au long terme (Wong et al., 2010). Etant donné que les cellules MuStem expriment fortement Klf4, il me paraîtrait intéressant d'aller rechercher leur activité télomérase.

Nos résultats montrent que les cellules MuStem expriment le transcrit Nanog et que cette expression se traduit par la présence de la protéine. Il a été décrit, dans les CSM adultes dérivées de la moelle osseuse, que NANOG surexprime fortement les gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la réplication de l'ADN et la réparation des dommages à l'ADN, et augmente leur prolifération et leur clonogénicité. NANOG est aussi capable de contrecarrer les effets de l'âge de l'organisme sur la prolifération des CSM et leur potentiel de différenciation myogénique (Han et al., 2012). Nous pouvons alors formuler l'hypothèse que l'expression de NANOG par les cellules MuStem permet d'augmenter et/ou de maintenir leur capacité proliférative ainsi que leur potentiel de différenciation myogénique.

Etant donné les résultats obtenus pour les facteurs de transcription Klf4, Oct3-4 et Nanog, il semble particulièrement intéressant de rechercher l'expression d'autres marqueurs embryonnaires dans les cellules MuStem tels que les marqueurs de surface SSEA-1 (Stage specific embryonic antigen 1), SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-84 et CD49e. Des premiers résultats FACS, obtenus sur 6 lots cellulaires, nous indiquent que la majorité des cellules MuStem expriment à leur surface CD49e et qu'une partie exprime SSEA4 (données

non montrées). SSEA-4 est un marqueur qui a également été identifié comme étant exprimé par les CSM (Gang et al., 2007; Riekstina et al., 2009). Nous montrons ainsi pour la première fois que les cellules MuStem expriment à la fois des facteurs de transcription et des marqueurs de surface d'origine embryonnaire, spécifiques des cellules souches.

Concernant les MRFs, nous montrons que la grande majorité des lots de cellules MuStem testés expriment le transcrite Myf5 mais qu'il existe une hétérogénéité d'expression plus marquée concernant Pax7, MyoD et MyoG. Les lots cellulaires qui expriment Pax7 expriment en même temps Myf5, MyoD et MyoG et correspondent donc à des cellules plus engagées dans le programme myogénique. D'un point de vue technique, cette différence d'engagement des cellules MuStem observée pourrait être liée aux conditions de culture telles que la densité cellulaire et les changements de milieu. De plus, les différents lots cellulaires sont tous comparés après 5 passages en culture, mais ils n'ont pas tous effectué le même nombre de doublements de population. Certains lots ayant réalisé un plus grand nombre de doublements de population pourraient s'engager plus rapidement dans le programme myogénique ou inversement. La différence d'engagement dans le programme myogénique entre les lots pourrait également être liée à l'hétérogénéité intrinsèque de la population cellulaire MuStem ou bien aux caractéristiques du donneur et plus particulièrement son âge. Suite à ces résultats transcriptionnels, il convient de rechercher la présence protéique des MRFs dans les cellules MuStem. Des premiers résultats d'immunocytochimie nous indiquent que plus de 90% des cellules MuStem sont Myf5<sup>+</sup> et que moins de 1% sont MyoD<sup>+</sup> ou bien MyoG<sup>+</sup>. Les transcrits que nous identifions par RT-PCR pour MyoD et MyoG proviennent donc de quelques cellules qui les expriment fortement.

Afin de compléter cette étude, nous pourrions envisager de rechercher l'expression du facteur de transcription Six1. Les facteurs de transcription Six sont connus en tant que régulateurs de la myogenèse embryonnaire et Six1 a récemment été identifié comme étant exprimé par les progéniteurs myogéniques adultes (Le Grand et al., 2012; Relaix et al., 2013). Il régule l'auto-renouvellement des cellules satellites via la régulation de la voie Dusp6-ERK1/2 et joue un rôle important dans la régénération musculaire en contrôlant l'expression de MyoD et MyoG par les cellules satellites (Daubas and Buckingham, 2013; Le Grand et al., 2012; Kassar-Duchossoy et al., 2004; Sambasivan et al., 2013).

## 2.2 Etude de l'impact de l'environnement sur les cellules MuStem

### 2.2.1 Positionnement

Le comportement des cellules souches en termes d'auto-renouvellement, de différenciation, de survie, de mobilisation ou encore de migration et de prolifération est régulé par un ensemble complexe de signaux intrinsèques aux cellules mais aussi extrinsèques, provenant de leur niche. Comme évoqué dans la partie 2.3.4 de l'introduction bibliographique, les cellules souches sont en interaction directe avec d'autres cellules au même titre qu'avec la MEC, soumises à des contraintes et forces physiques, ou encore sous l'influence de facteurs solubles comme les cytokines et chémokines. Les ROS, et plus particulièrement le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , jouent un rôle important dans la régulation des cellules souches, en condition physiologique ou pathologique. Dans un contexte physiopathologique, les ROS peuvent être augmentées et créer un micro-environnement inflammatoire et oxydatif à l'origine de l'induction de dommages cellulaires ou de l'apoptose des cellules. Le rôle des ROS dans la modification de la niche des cellules souches commence à être étudié, notamment pour les CSH (Urao and Ushio-Fukai, 2013).

De nombreux travaux, effectués plus particulièrement sur les ES et les CSM, démontrent que la teneur en  $O_2$  joue un rôle dans le maintien des cellules souches (Drela et al., 2014; Forristal et al., 2010; Grayson et al., 2007; Hung et al., 2012). L'hypoxie augmente la prolifération des CSMs, leur migration mais régule aussi la production de facteurs de croissance et de manière plus générale les sécrétions cytokiniques (Hung et al., 2012; Rosová et al., 2008). L' $O_2$  augmente également l'expression de certains facteurs de pluripotence et peut modifier la balance auto-renouvellement/différenciation des cellules souches.

Dans cette étude, construite autour de deux axes, nous avons recherché dans un premier temps à mimer des conditions de stress oxydatif en plaçant les cellules MuStem en présence d' $H_2O_2$  et nous avons comparé leur survie à celle des myoblastes afin de déterminer si les cellules MuStem possèdent un avantage de résistance au stress oxydatif. Dans une seconde partie, nous avons étudié les répercussions d'un abaissement de la teneur en  $O_2$  sur le comportement des cellules MuStem. Pour se faire, la morphologie, la capacité proliférative ainsi que les modifications transcriptionnelles ont été déterminées sur des cellules MuStem placées à 20%, 5% et 1% d' $O_2$ . L'objectif a été d'appréhender le comportement des cellules MuStem à des taux d' $O_2$  qu'elles sont susceptibles de rencontrer *in vivo*. Nous avons

également cherché à déterminer quelles sont les conditions de culture optimales au pré-conditionnement des cellules MuStem, en vue d'une future utilisation thérapeutique.

## 2.2.2 Matériel et méthodes

### 2.2.2.1 Etude comparée du potentiel de survie des cellules MuStem et myoblastes en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### A. Culture cellulaire

Quatre lots de chaque type cellulaire (cellules MuStem et myoblastes) ont été mis en culture en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les différents lots cellulaires ont été décongelés dans du PBS-5% SVF à P3 puis ensemencés sur des supports gélatinés à une densité comprise entre 10 000 et 14 000 cellules/cm<sup>2</sup>. Les cellules MuStem sont cultivées dans leur milieu d'amplification de grade clinique tandis que les myoblastes sont placés dans le milieu suivant : HAMF12, 15% SVF, 1,25 ng/mL bFGF et 1% PSF. Lorsque les cultures cellulaires présentent une densité correspondant à plus de 75% de confluence, un passage est réalisé avec une solution d'acutase (Sigma-Aldrich, MO, USA) diluée au 1/3 dans du PBS (5 à 10 min, 37°C). Les cellules sont centrifugées (400 g, 10 min) puis sont numérées en cellule de Mallassez après coloration au bleu trypan et réensemencées. L'étude de survie en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été réalisée sur les cellules à P5.

#### B. Test de survie en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Pour chaque lot, les cellules ont été ensemencées à 60 000 cellules/puits sur 3 plaques de 6 puits gélatinés qui sont ensuite arrêtées aux temps 24, 48 et 72 heures. Les cellules sont laissées 4 h à 37°C afin de permettre leur adhésion puis l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) est ajouté à différentes concentrations par lot : 0, 100 ou 200 µM. L'expérience a été réalisée en duplicat (2 puits par concentration d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et par lot cellulaire).

Aux différents temps, des clichés des cellules ont été réalisés et les cellules ont été récupérées. Le surnageant de culture pouvant contenir des cellules non-adhérées a été récupéré et les puits ont été rincés avec du PBS. Les cellules ont été décrochées du support à l'aide d'une solution d'acutase diluée au 1/3 dans du PBS (5 à 10 min, 37°C). Les puits ont été de nouveau rincés avec du PBS et tous les volumes de lavage récupérés. Les cellules ont ensuite été centrifugées (300 g, 10 min) et les culots cellulaires repris dans 300 µL de PBS-2% SVF. Les suspensions ont ensuite été transférées dans un tube Trucount (BD Biosciences, CA,

USA) afin de réaliser un comptage cellulaire précis par cytométrie de flux (FACS Aria, BD Biosciences). Ces tubes contiennent un nombre connu de billes fluorescentes, ce qui permet de déterminer par FACS le nombre absolu de cellules dans l'échantillon en comparant le nombre d'évènements «cellulaires» passés au nombre d'évènements «billes». Un marquage 7-AAD (7-Aminoactinomycine D, Sigma-Aldrich) est aussi réalisé afin de visualiser les cellules mortes.

### C. Tests statistiques

Les effets du temps et de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur le pourcentage de cellules vivantes par rapport à la condition non traitée pour les myoblastes ou cellules MuStem ont été analysés avec un modèle linéaire à effet mixte qui permet de prendre en compte le protocole de mesure répétée. Les conditions d'indépendance et de normalité des résidus d'une part et les effets aléatoires d'autre part ont été vérifiés par des graphiques sur les résidus comme recommandé dans le cadre de la théorie de l'estimation paramétrique.

#### 2.2.2.2 Etude des cellules MuStem en condition hypoxique

### A. Mise en culture des cellules MuStem en conditions normoxique et hypoxique

Quatre lots de cellules MuStem ont été utilisés pour cette étude. La culture des cellules en condition hypoxique a été réalisée avec les équipements de l'UMR 892 INSERM CRCNA (IRS, Nantes). La chambre hypoxique (Ruskin Technology, UK) utilisée permet de contrôler en permanence la teneur en O<sub>2</sub>, en CO<sub>2</sub>, le taux d'humidité et la température. L'abaissement du taux d'O<sub>2</sub> est réalisé par une saturation en azote. Les cellules ont été décongelées à l'UMR à P3 et deux passages en culture ont été réalisés avant qu'elles ne soient placées à P5 dans les trois conditions différentes de teneur en O<sub>2</sub> : en normoxie (20% d'O<sub>2</sub>), en hypoxie à 1% ou 5% d'O<sub>2</sub>. A J0, les cellules sont comptées et préparées à l'UMR puis sont divisées en deux pour pouvoir être ensemencées en normoxie et en hypoxie sur des supports de culture F25 gélatinés à une densité de 10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup>. Trois F25 sont ensemencées à J0 par condition.

### B. Suivi dans le temps des cultures

Au 3<sup>ème</sup> jour, 5<sup>ème</sup> jour, 7<sup>ème</sup> jour et 10<sup>ème</sup> jour (J3, J5, J7 et J10) de culture, des clichés ont été réalisés afin d'observer la morphologie des cellules. La prolifération cellulaire a été observée par un double comptage en cellule de Mallasez et en FACS avec des tubes Trucount. Des culots cellulaires à secs ont aussi été réalisés pour l'analyse transcriptionnelle.

A J3, J5, J7 et J10, les surnageants de culture sont récupérés ainsi que les cellules adhérentes qui sont remises en suspension à l'aide de l'acutase diluée au tiers. Les cellules sont ensuite centrifugées (400 g, 10 min) et le culot cellulaire est repris dans 1 mL de PBS-2% SVF. Cent  $\mu$ L sont alors déposés dans un tube Trucount qu'il faut alors bien vortexer. Un comptage au bleu de Trypan et cellule de Mallassez est également réalisé. Les 900  $\mu$ L restants sont placés dans un tube « eppendorf » et centrifugés (2000 rpm, 10 min) pour réaliser des culots secs de cellules qui sont immédiatement placés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . A J5, une flasque F25 par lot permet de récupérer des cellules que l'on réensemence de nouveau sur deux flasques F25 gélatinées à une densité de  $10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> afin de constituer les flasques de J7 et J10. Les cellules à J7 et J10 subissent donc un passage en culture, en normoxie ou en hypoxie.

### C. RT-qPCR

Les ARN des culots de cellules MuStem réalisés à J5 ont été extraits selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.1.2.1 et les RT-qPCR ont été effectuées comme décrit en 2.1.2.2. Les amorces utilisées sont listées dans le tableau 2.

	Nom(s) du gène ciblé		Séquence des amorces (5'-3')	Produit (pb)	Numéro d'accèsion
Gènes de Référence	RPS18	For	ACC AAG AGG GCG GGA GAA	85	NM_022551.2
		Rev	CTG GGA TCT TGT ACT GGC GTG		
Marqueurs de l'hypoxie	HIF-1 $\alpha$	For	AAG ACA CAG AAG CAA AGA ACC CA	161	NM_001530.3
		Rev	AGG ACT TGC GCT TTC AGG G		
	HIF-2 $\alpha$	For	AAG TCT ACA ACA ACT GCC CTC C	102	NM_001430.4
		Rev	GGG ATG GGT GCT GGA TTG G		
VEGFA	For	CCT TGC CTT GCT GCT CTA CC	140	NM_001025366.2	
	Rev	GGG TCT CGA TTG GAT GGC AGT			
Marqueur de pluripotence	KLF4	For	AGA GGA GCC CAA GCC AAA GA	181	NM_004235.4
		Rev	TTT CCA TCC ACA GCC GTC CCA G		

**Tableau 2 Liste des amorces utilisées pour les RT-PCR et qPCR en temps réel**

Le numéro d'accèsion GenBank et la taille des amplicons en paires de bases (pb) obtenus pour chaque gène sont indiqués.

## 2.2.3 Présentation des résultats

### 2.2.3.1 Etude comparée du potentiel de survie à un stress oxydatif : cellules MuStem vs myoblastes

Des cellules MuStem et leurs myoblastes associés, c'est-à-dire qui ont été isolés à partir des mêmes prélèvements musculaires, ont été soumis à un stress oxydatif suite à l'ajout dans leur milieu de culture d' $\text{H}_2\text{O}_2$  à une concentration de 100  $\mu\text{M}$  et 200  $\mu\text{M}$ . La condition contrôle correspond aux mêmes lots cellulaires cultivés sans ajout d' $\text{H}_2\text{O}_2$  au milieu. Des clichés ont été réalisés et le nombre de cellules vivantes a été déterminé à 24, 48 et 72 H par un comptage par FACS associé à un marquage 7AAD.

Les cellules MuStem et myoblastes cultivées en condition de stress oxydatif présentent quelques débris dans le surnageant dès 24 H et plus particulièrement dans la condition 200  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Après 48 H, la présence de débris cellulaires est augmentée et il ne reste que très peu de myoblastes adhérents au support de culture à 200  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figure 24). Ces derniers sont d'ailleurs rétractés tandis que les cellules MuStem, plus nombreuses à rester adhérentes, conservent leur allure fusiforme. Après 72 H, peu de cellules sont visualisables à 100 et 200  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$ .

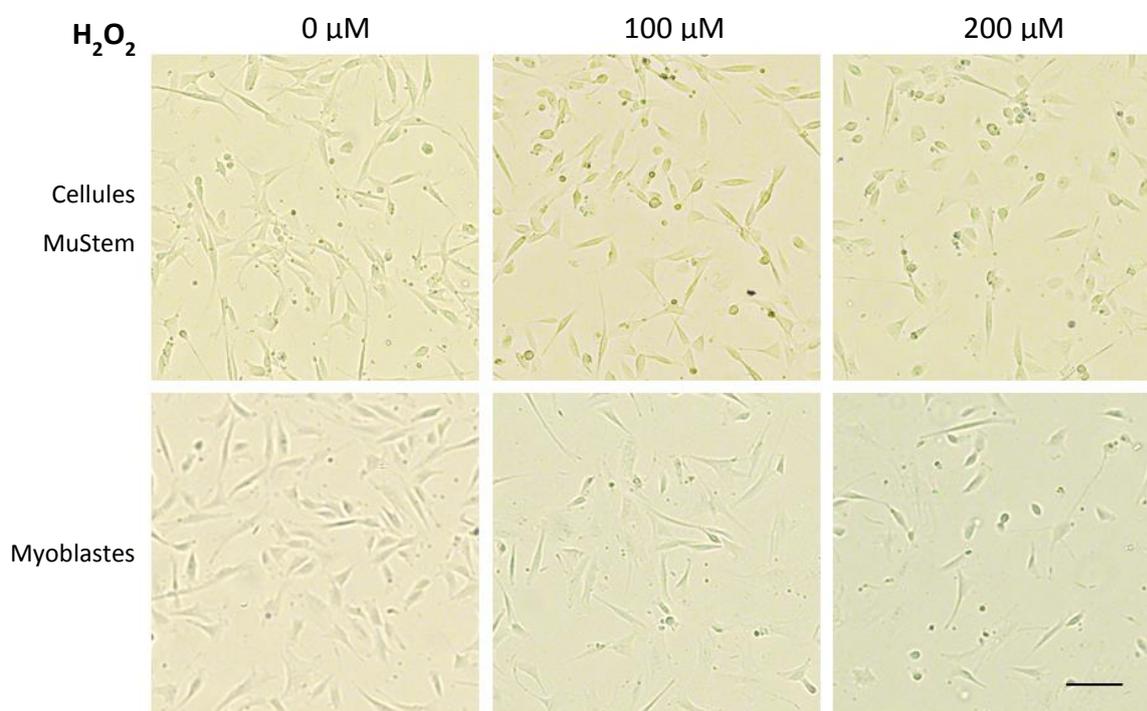
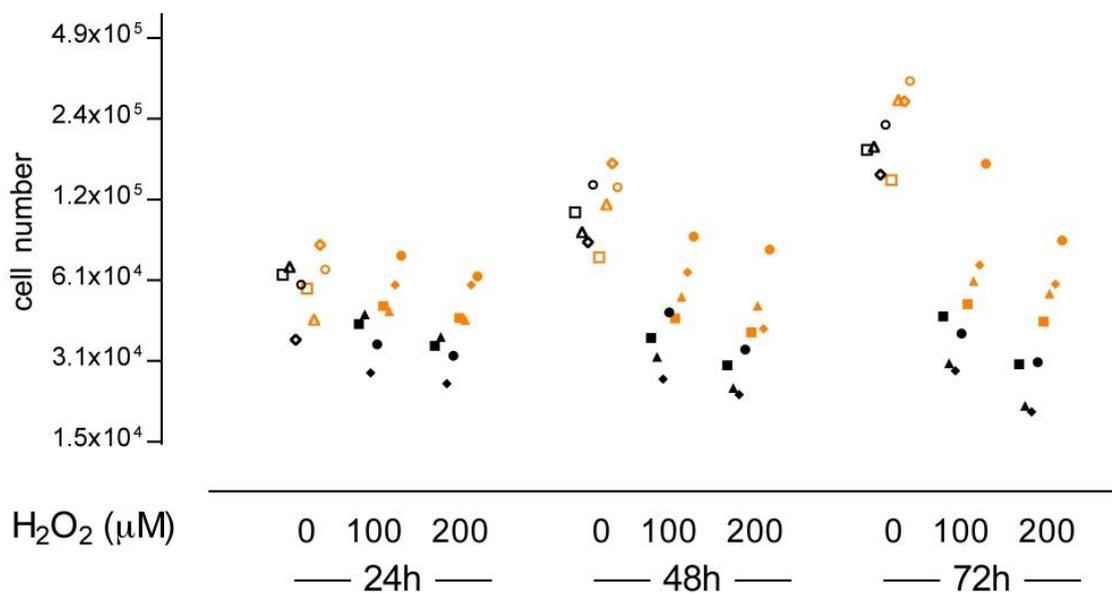


Figure 24 **Morphologie des cellules après 48H en présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$**

En condition de stress oxydatif, des débris sont retrouvés dans le surnageant des cultures de cellules MuStem et de myoblastes. On retrouve très peu de cellules myoblastes adhérentes après une exposition de 48 H à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  200  $\mu\text{M}$ . La barre d'échelle représente 50  $\mu\text{m}$ .

La prolifération des lots de cellules MuStem et myoblastes étudiés a tout d'abord été analysée en absence d' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figure 25). Notre valeur de référence est définie par le nombre de cellules déterminé par la technique Trucount à 24 H post-ensemencement. Ces nombres correspondent à  $6,3 \cdot 10^4 \pm 1,6 \cdot 10^4$  et  $5,7 \cdot 10^4 \pm 1,4 \cdot 10^4$  cellules pour les cellules MuStem et les myoblastes respectivement. Les cellules MuStem prolifèrent rapidement et doublent leur population en un jour passant à  $1,2 \cdot 10^5 \pm 0,4 \cdot 10^5$  cellules en 48 H puis à  $2,6 \cdot 10^5 \pm 0,8 \cdot 10^5$  cellules en 72 H. Les myoblastes présentent une moindre prolifération ( $1,1 \cdot 10^5 \pm 0,2 \cdot 10^5$  cellules à 48 H et  $1,9 \cdot 10^5 \pm 0,3 \cdot 10^5$  cellules à 72 H). Il est à noter une plus forte hétérogénéité de prolifération entre les lots pour les cellules MuStem.



**Figure 25 Prolifération cellulaire et survie des cellules soumises à un stress oxydatif induit à l' $\text{H}_2\text{O}_2$**

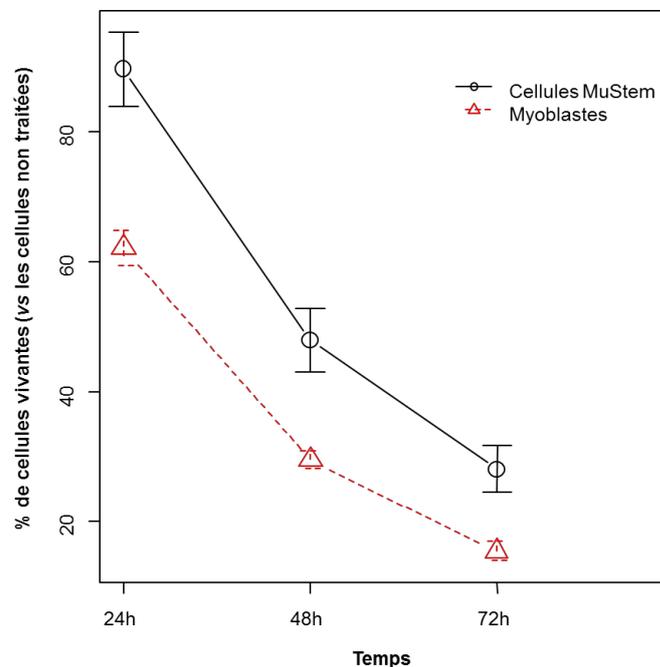
Quatre lots de cellules MuStem (orange) et quatre lots de cellules myoblastes (noir) isolés à partir de prélèvements musculaires de quatre donneurs différents (un symbole par donneur) ont été cultivés en absence (symboles vides) et en présence (symboles pleins) d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , à 100 et 200  $\mu\text{M}$ . Les cellules sont comptées à l'aide de tubes Trucount® après 24, 48 et 72 heures.

Après une exposition des cellules à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$ , le nombre de cellules MuStem tend à continuer d'augmenter légèrement au cours du temps tandis que globalement, le nombre de myoblastes se stabilise (Figure 25). Exposées à 200  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , les cellules MuStem prolifèrent faiblement tandis que les myoblastes diminuent en nombre dès 48 H. Un lot de cellules MuStem prolifère tout particulièrement en présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$  puisqu'il atteint  $1,7 \cdot 10^5$  cellules à 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $0,86 \cdot 10^5$  cellules à 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  en 72 H. De plus, il est intéressant de souligner l'effet dose de l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Après 72 H en condition oxydative, 100 ou

200  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , tous les lots de cellules MuStem ont un nombre de cellules supérieur aux myoblastes. Ainsi, sous un stress oxydatif induit, les cellules MuStem se maintiennent en nombre supérieur par rapport aux myoblastes.

Afin de tenir compte de la capacité proliférative plus importante des cellules MuStem par rapport aux myoblastes et de l'hétérogénéité de la prolifération des différents lots cellulaires testés, il a été calculé le pourcentage de cellules vivantes par rapport au nombre de cellules vivantes dans la condition contrôle sans  $\text{H}_2\text{O}_2$  pour chaque temps. C'est ce pourcentage que nous appellerons pourcentage de survie.

Les analyses statistiques démontrent, avant tout, que les interactions entre les variables explicatives (patient donneur, temps, concentration d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , type cellulaire) sur le pourcentage de survie ne sont pas significatives. Un modèle additif a donc été utilisé pour les tests statistiques. Le pourcentage de survie des cellules MuStem est significativement plus élevé que celui des cellules myoblastes ( $p < 0,0001$ ) (Figure 26). De plus, le pourcentage de survie est significativement diminué avec le temps (Figure 26). Le pourcentage de survie à 24H est significativement plus élevé que celui à 48H ( $p < 0,0001$ ) et ceux-ci sont également plus élevés que celui à 72H ( $p < 0,0001$ ).

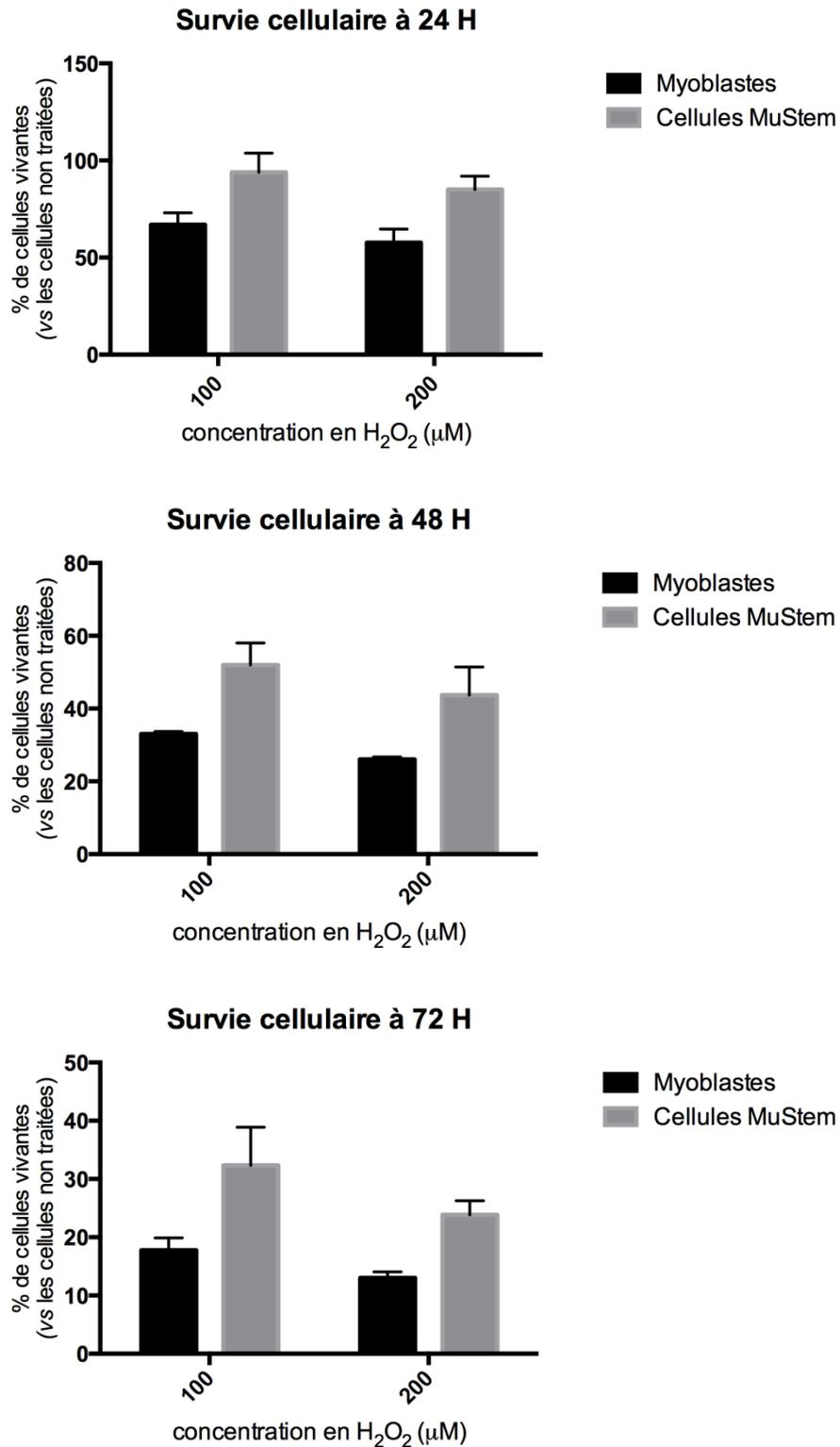


**Figure 26 Pourcentages moyennés de survie des cellules MuStem et myoblastes après exposition à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  en fonction du temps**

Les moyennes des pourcentages de cellules vivantes, exposées indifféremment à 100 ou 200  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , par rapport à la condition contrôle non traitée, sont représentées pour les myoblastes ( $n=4$ ) et les cellules MuStem ( $n=4$ ) à 24 H, 48 H et 72 H. Les écart-types sont représentés.

Il y a également un effet de la concentration en  $H_2O_2$  sur la survie des cellules, myoblastes ou MuStem, puisque le pourcentage de survie dans le groupe exposé à 200  $\mu M$  d' $H_2O_2$  est significativement plus faible que celui exposé à 100  $\mu M$  d' $H_2O_2$  ( $p=0,01$ ). Le graphique de la Figure 27 représente la survie cellulaire aux différents temps et aux différentes concentrations d' $H_2O_2$ .

Ainsi, il apparait clairement que, dans les présentes conditions de culture, les cellules MuStem humaines résistent mieux au stress cellulaire induit à l' $H_2O_2$  que les myoblastes aux différents temps testés.



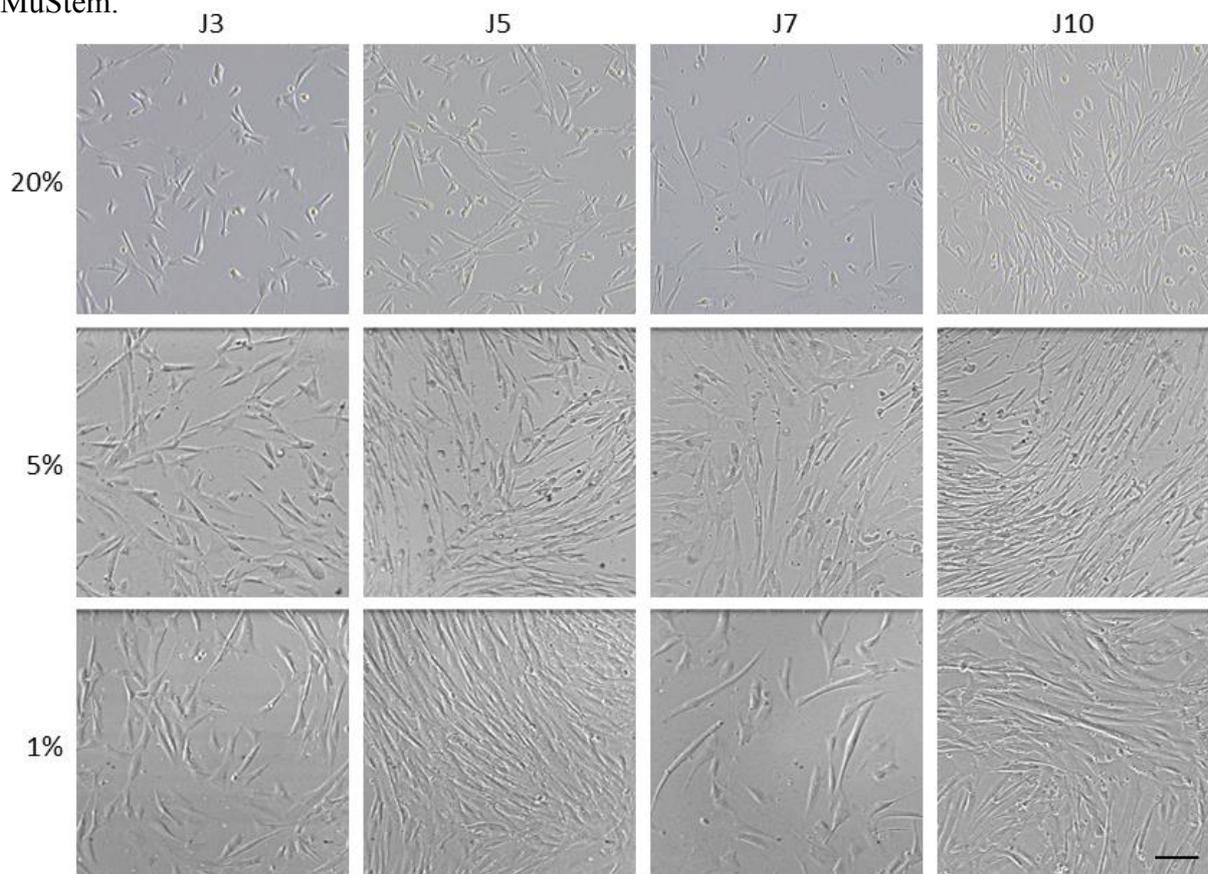
**Figure 27 Comparaison de la survie cellulaire des cellules MuStem par rapport aux myoblastes après exposition à 100 ou 200 μM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, à 24, 48 et 72 heures**

Les moyennes des pourcentages de cellules vivantes, par rapport à la condition contrôle non traitée, sont représentées pour les myoblastes (n=4) et les cellules MuStem (n=4) à 24 H, 48 H et 72 H. Les erreurs standards de la moyenne (SEM) sont représentées.

### 2.2.3.2 Etude des cellules MuStem en condition hypoxique

#### A. Morphologie des cellules MuStem

Quatre lots de cellules MuStem ont étéensemencés à P5 dans 3 conditions différentes de teneur en  $O_2$  : une condition normoxique à 20% d' $O_2$  et deux conditions hypoxiques à 5% et 1% d' $O_2$ . Des clichés des cellules MuStem ont été réalisés dans ces différentes conditions et aux différents temps étudiés J3, J5, J7 et J10. Les observations répétées des différents lots n'ont pas montré une présence de débris cellulaires en condition hypoxique à la différence de ce qui était observé en condition oxydative induite par ajout d' $H_2O_2$ . Sur un plan qualitatif, l'analyse comparée, hypoxie vs normoxie, n'a montré aucun changement morphologique des cellules MuStem en conditions hypoxiques, 5% ou 1% d' $O_2$ , en termes de proportion de cellules rondes et fusiformes (Figure 28). Nous ne mettons pas non plus en évidence une augmentation du nombre de cellules non adhérentes. Ainsi, dans ces conditions, la teneur en  $O_2$  de l'environnement ne semble donc pas avoir d'impact sur la morphologie des cellules MuStem.

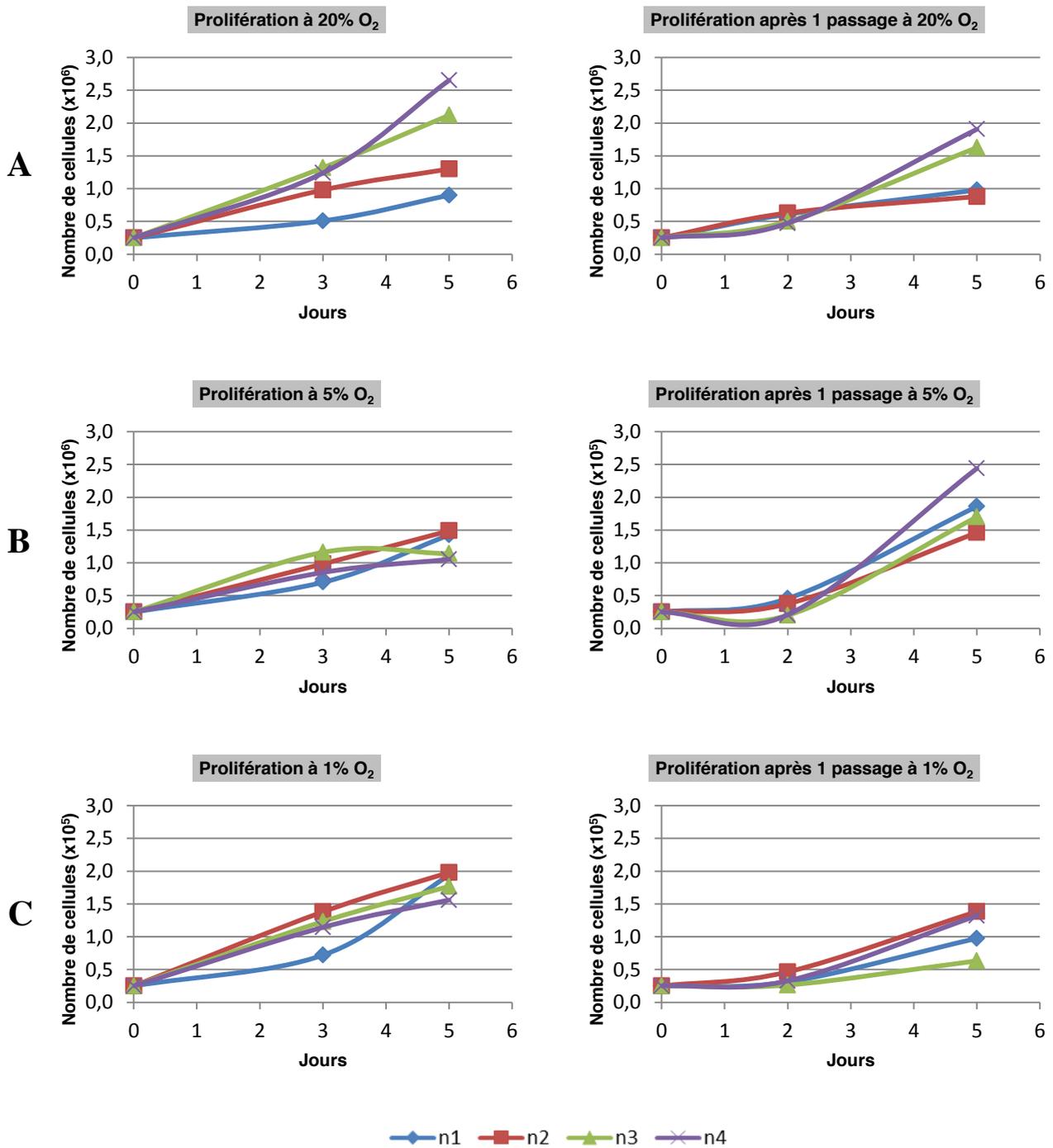


**Figure 28 Morphologie des cellules MuStem en conditions normoxique (20%  $O_2$ ) et hypoxiques (5% et 1%  $O_2$ )**

Des clichés des cellules MuStem ont été réalisés à J3, J5, J7 et J10 dans les différentes conditions de teneur en  $O_2$  (lot n1 présenté). La barre d'échelle représente 50  $\mu m$ .

## B. Prolifération

La prolifération des cellules MuStem dans les différentes conditions de teneur en O<sub>2</sub> a été suivie sur 10 jours en réalisant des comptages à J3 et J5 puis à J7 et J10, après un passage réalisé à J5. Parmi les 4 lots cellulaires testés, nous observons des différences de prolifération en condition normoxique. Nous distinguons les lots n1 et n2, des lots n3 et n4, les deux premiers proliférant moins rapidement que les deux suivants. Initialementensemencés à 0,25.10<sup>6</sup> cellules, les lots n1 et n2 atteignent 0,9.10<sup>6</sup> et 1,3.10<sup>6</sup> cellules respectivement en 5 jours tandis que les lots n3 et n4 atteignent 2,1 et 2,7.10<sup>6</sup> cellules (Figure 29 A). Cette différence de prolifération est maintenue après un passage en culture. A J10 soit l'équivalent du cinquième jour post-passage, les lots n1 et n2 s'élèvent à 1.10<sup>6</sup> et 0,9.10<sup>6</sup> cellules alors que les lots n3 et n4 sont au nombre de 1,6 et 1,9.10<sup>6</sup> cellules. De manière intéressante, nous n'observons plus cette hétérogénéité après la mise en hypoxie des cellules à 5% ou 1% d'O<sub>2</sub> (Figure 29 B et C). En effet après 5 jours à 5% d'O<sub>2</sub>, les 4 lots sont entre 1,1 et 1,5.10<sup>6</sup> cellules et à 1% entre 1,6 et 2,0.10<sup>6</sup> cellules. De plus, il s'avère que les lots n3 et n4 qui proliféraient plus rapidement en normoxie sont ceux qui prolifèrent moins en hypoxie sur 5 jours. En effet, leur prolifération est moindre à 1% et ceci est encore plus accentué à 5% puisque seulement 1,1.10<sup>6</sup> et 1,0.10<sup>6</sup> cellules des lots n3 et n4 sont comptées à J5 à 5% O<sub>2</sub>. Les cellules des lots n1 et n2 voient en revanche leur prolifération augmentée en condition hypoxique sur 5 jours. A J5, elles sont 1,4 et 1,5.10<sup>6</sup> à 5% d'O<sub>2</sub> alors qu'elles sont 1,9 et 2,0.10<sup>6</sup> à 1% d'O<sub>2</sub>. Après 5 jours en condition hypoxique, on observe donc que les lots les plus prolifératifs en normoxie prolifèrent moins en hypoxie et que les lots les moins prolifératifs prolifèrent plus, réduisant ainsi l'hétérogénéité inter-lots. Après un passage en condition hypoxique, les cellules prolifèrent davantage à 5% qu'à 1% d'O<sub>2</sub>, soit l'inverse de ce qui était observé à J5. A J10, on compte entre 1,5 à 2,4.10<sup>6</sup> cellules selon les lots à 5% d'O<sub>2</sub> et entre 0,6 et 1,6.10<sup>6</sup> cellules à 1% d'O<sub>2</sub>. Le lot n4 prolifère particulièrement à 5% d'O<sub>2</sub>, atteignant 2,4.10<sup>6</sup> cellules à J10.



**Figure 29 Courbes de prolifération des cellules MuStem en conditions normoxique (20% O<sub>2</sub>) et hypoxiques (5% et 1% O<sub>2</sub>)**

Les cellules MuStem sont initialement ensemencées dans les différentes conditions de teneur en O<sub>2</sub> à 250 000 cellules puis sont comptées à J3 et J5. Après un passage en culture à J5, les cellules sont réensemencées à 250 000 cellules et sont dénombrées à J7 et J10 équivalent à J2 et J5 post-passage. Les courbes sont réalisées à partir des comptages Mallassez.

Afin de pouvoir comparer plus aisément la prolifération des cellules MuStem en hypoxie à 5 ou 1% d'O<sub>2</sub>, les rapports du nombre de cellules hypoxie/normoxie ont été calculés pour chaque temps et sont représentés dans le Tableau 3.

	n1		n2		n3		n4	
	5%	1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%
<b>J3</b>	1,76	1,41	1,23	1,41	0,98	0,93	0,79	0,92
<b>J5</b>	1,61	2,17	1,45	1,53	0,43	0,92	0,43	0,68
<b>J7</b>	1,24	0,51	0,92	0,74	0,60	0,53	0,50	0,69
<b>J10</b>	1,41	1,00	1,59	1,57	0,92	0,39	1,22	0,69

**Tableau 3 Facteurs d'amplification des cellules obtenues entre les conditions hypoxiques et normoxique**

Les rapports du nombre de cellules en hypoxie 5% ou 1% d'O<sub>2</sub> par rapport au nombre de cellules en normoxie ont été calculés pour J3, J5, J7 et J10. Les cellules à J5 ont été réensemencées à pour pouvoir obtenir des cellules à J7 et J10.

Si l'on se place à 5% d'O<sub>2</sub>, les cellules des lots n1 et n2 ont plus proliféré qu'en normoxie avec des rapports de 1,61 et 1,45 tandis que les lots n3 et n4 à l'inverse ont moins proliféré avec un rapport identique pour les 2 lots de 0,43. A J10, les lots n1 et n2 continuent de mieux proliférer à 5% d'O<sub>2</sub> tandis que les lots n3 et n4 montrent une prolifération équivalente à la normoxie avec des rapports de 0,92 et 1,22.

A 1% d'O<sub>2</sub>, les lots n1 et n2 ont fortement proliféré avec des rapports hypoxie/normoxie de 2,17 et 1,53 à J5. A J10, le lot n1 a proliféré de manière équivalente à la normoxie et le lot n2 a continué de proliférer davantage. Les lots n3 et n4 ont eu une prolifération équivalente ou moindre par rapport à la normoxie à J5 et ils ont très nettement moins proliféré après un passage à 1% d'O<sub>2</sub>, avec des rapports de 0,39 et 0,69 à J10.

Ainsi, après un passage en hypoxie, 2 lots sur 4 de cellules MuStem ont très clairement moins proliféré à 1% d'O<sub>2</sub> qu'en normoxie tandis qu'à 5% d'O<sub>2</sub> la prolifération des cellules MuStem est équivalente à la condition normoxique voir augmentée. L'abaissement du taux d'O<sub>2</sub> à 5% n'est donc pas délétère aux cellules MuStem sur 10 jours et nous en concluons qu'il semble donc préférable de placer les cellules MuStem à 5% d'O<sub>2</sub> plutôt qu'à 1%. Cette teneur en O<sub>2</sub> de 5% est par ailleurs plus physiologique que celle de 20%.

### 2.2.3.3 Etude transcriptionnelle : hypoxie vs normoxie

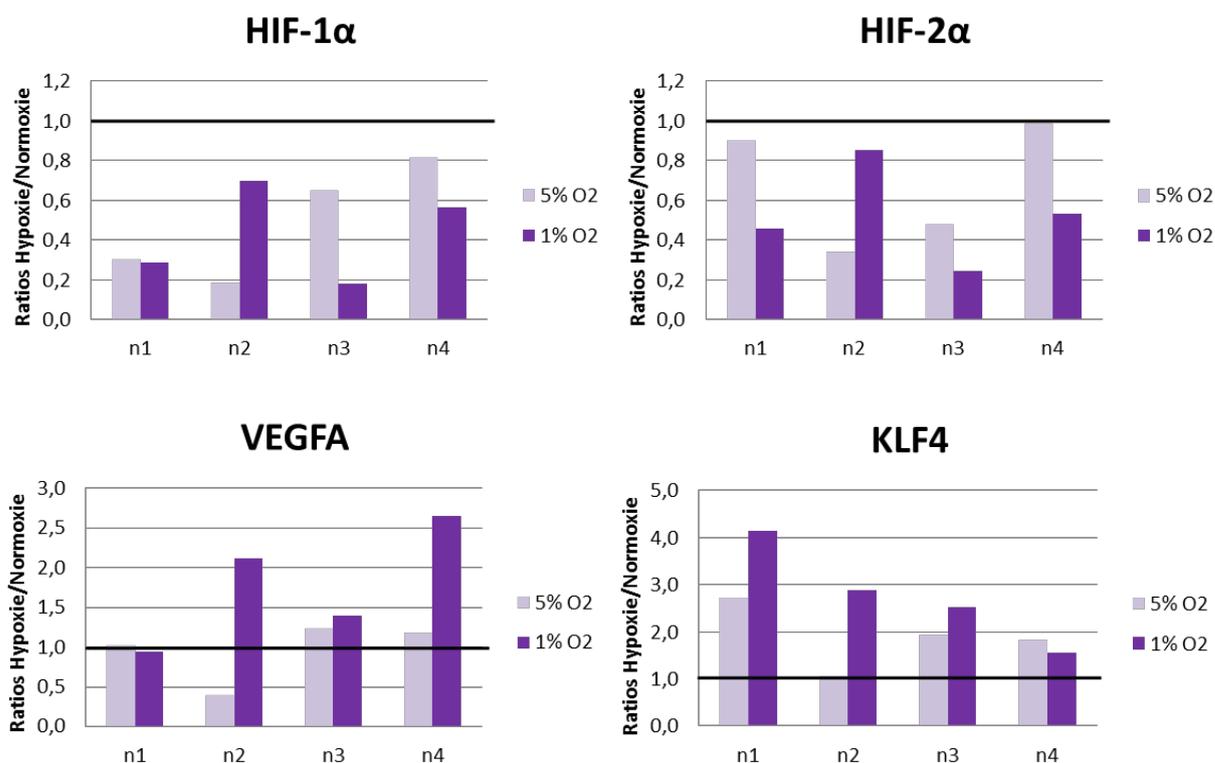
Nous avons montré que les cellules MuStem, dans leur milieu, résistent à de faibles teneurs en O<sub>2</sub>. A 5% d'O<sub>2</sub> plus particulièrement, nous n'observons aucune modification importante de morphologie et de prolifération. La suite de ce travail a donc consisté à rechercher, au niveau transcriptionnel, si cela se traduisait par une adaptation rapide ou tolérance des cellules MuStem ou bien par des mécanismes de résistance associés à une activation de certaines voies de signalisation.

Dans un premier temps, les expressions des deux isoformes du facteur induit par l'hypoxie, HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$ , ont été recherchées dans les cellules MuStem placées pendant 5 jours à 20%, 5% ou 1% d'O<sub>2</sub>. Nos résultats montrent que HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  sont sous-exprimés dans les cellules MuStem en condition hypoxique, que ce soit à 5% ou 1% d'O<sub>2</sub>, par rapport à la condition normoxique (Figure 30). Cette diminution d'expression semble plus importante à 1% d'O<sub>2</sub> qu'à 5% d'O<sub>2</sub>.

Ces résultats inattendus, d'une diminution de facteurs décrits comme induits par l'hypoxie, nous ont amené à rechercher l'expression d'une de leurs cibles directes. En effet, sous l'effet de l'hypoxie, les différentes isoformes de HIF sont connus pour être transloquées au noyau et y agir comme facteur transcriptionnel sur un certain nombre de gènes dont l'un des plus étudiés est VEGFA.

L'expression de VEGFA varie peu dans les cellules MuStem après 5 jours à 5% d'O<sub>2</sub> (Figure 30). En revanche, nous montrons une augmentation de VEGFA dans les cellules MuStem avec un rapport de  $1,8 \pm 0,8$  après 5 jours à 1% d'O<sub>2</sub>. Les lots sont assez hétérogènes concernant l'expression de VEGFA en hypoxie 1% d'O<sub>2</sub>. En effet, les deux lots n2 et n4 montrent une expression de VEGFA plus de deux fois supérieure à celle obtenue en normoxie tandis que les 2 autres lots montrent une expression peu modifiée, avec des rapports de 1,40 et 0,94. Nous soulignons cependant une tendance à l'augmentation de l'expression de VEGFA dans les cellules MuStem dès 5 jours à 1% d'O<sub>2</sub>. Ce résultat est en concordance avec les données de la littérature qui décrivent une augmentation d'expression de VEGFA dans des cellules placées en condition hypoxique. Il serait ainsi intéressant de compléter ces résultats par l'expression de VEGFA dans les cellules MuStem après 10 jours en condition hypoxique.

Nous avons également recherché l'effet d'une faible teneur en O<sub>2</sub> sur l'expression de KLF4 par les cellules MuStem étant donné qu'il est décrit dans de nombreux types cellulaires une augmentation d'expression des facteurs de pluripotence en condition hypoxique. Nos résultats montrent une augmentation d'expression de KLF4 dans les cellules MuStem après 5 jours à 5% d'O<sub>2</sub> avec un rapport de  $1,9 \pm 0,7$  et cette augmentation est supérieure à 1% d'O<sub>2</sub> avec un rapport de  $2,8 \pm 1,1$  (Figure 30).



**Figure 30 Modifications transcriptionnelles des cellules MuStem après 5 jours en conditions hypoxiques (5% et 1% O<sub>2</sub>)**

L'expression de HIF-1α, HIF-2α, VEGFA et KLF4 a été déterminée par RT-qPCR dans les trois conditions de teneur en O<sub>2</sub> : 20%, 5% et 1% d'O<sub>2</sub>. La normalisation des données brutes a été réalisée avec le contrôle interne RPS18 puis les expressions relatives ont été déterminées par la méthode des  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Les rapports des expressions relatives obtenues en condition hypoxique par rapports à celles obtenues en condition normoxique sont représentés sur ce graphique. La condition normoxique se situe donc à 1 (trait noir).

## 2.2.4 Discussion

Dans un contexte de transplantation cellulaire, il apparaît important d'étudier le comportement des populations cellulaires candidates à la thérapie de la DMD en fonction de leur micro-environnement. Les conditions classiques de culture *in vitro* des cellules ne reproduisent pas les conditions rencontrées *in vivo*. Notre étude a donc cherché à étudier le comportement des cellules MuStem en condition oxydative ainsi qu'en condition hypoxique dans le but d'identifier la résistance et l'adaptation des cellules MuStem aux changements environnementaux.

Certaines populations cellulaires sont décrites comme particulièrement résistantes au stress oxydatif. En 2009, Urish et al. ont attribué aux cellules MDSC murines des propriétés anti-oxydantes. Ils ont montré que les MDSC présentent de plus faibles taux de mortalité que les myoblastes après exposition à un stress oxydatif induit à l' $H_2O_2$  (Urish et al., 2009). De plus, les auteurs ont démontré qu'une exposition à l' $H_2O_2$  des MDSC n'altère pas leur différenciation myogénique *in vitro* contrairement aux myoblastes. Ainsi, les capacités anti-oxydantes des MDSC leur permettraient de survivre au stress oxydatif inhérent à la transplantation tout en conservant leur potentiel de différenciation. Additionnée à leur importante capacité proliférative à long terme, cette caractéristique des MDSC expliquerait leur capacité régénérative *in vivo* supérieure à celle des myoblastes (Qu-Petersen et al., 2002).

En 2011, une hypothèse a été formulée par Okada *et al.* selon laquelle la technique de préplating sélectionnerait de manière inhérente des cellules résistantes au stress dans la fraction à adhérence tardive puisque ces cellules sont capables de tolérer le stress lié à la suspension durant l'isolement (Okada et al., 2012). Cette hypothèse s'appuie sur le fait que les cellules MDSC humaines à adhérence tardive, nommées SAC (Slow Adhering Cells), ont montré de meilleurs taux de survie que les RAC (Rapidly Adhering Cells) sous conditions de stress oxydatif et inflammatoire *in vitro*. Cette résistance aux stress des SAC est associée à une amélioration de la fonction cardiaque après leur injection dans un modèle d'infarctus du myocarde (Okada et al., 2012).

Nos résultats démontrent que les cellules MuStem humaines, isolées sur la base de leur adhérence tardive par une technique adaptée du préplating, présentent également une meilleure survie cellulaire que les myoblastes, après une exposition *in vitro* à un stress oxydatif induit à l' $H_2O_2$ , pendant 24, 48 ou 72 heures. Les cellules MuStem présenteraient

donc des propriétés anti-oxydantes qui semblent particulièrement importantes pour leur survie post-transplantation.

Une limitation possible de notre étude est que les cellules MuStem et les cellules myoblastes ne sont pas cultivées dans le même milieu. Ainsi, nous ne comparons pas seulement les cellules entre elles mais bien les cellules dans leurs conditions de culture respectives. Chaque type cellulaire est bien souvent caractérisé dans son milieu qui lui est adapté, et il semble difficile de pouvoir comparer les populations cellulaires dans un même milieu. Etant donné que le nombre de cellules MuStem est globalement maintenu voir légèrement augmenté après 72h en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nous pourrions aussi nous demander si les cellules vivantes correspondent majoritairement à des cellules qui survivent et prolifèrent moins ou bien si elles résultent de la prolifération de quelques cellules résistantes.

Dans le but de mieux comprendre les propriétés anti-oxydantes des cellules MuStem, il me paraîtrait intéressant de comparer les taux de ROS intracellulaires après exposition à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre les cellules MuStem et les cellules myoblastes. Nous pourrions également regarder si les taux d'enzymes anti-oxydantes, piégeant les radicaux libres de l'O<sub>2</sub>, telles que la superoxyde dismutase ou la glutathione peroxydase sont plus élevés dans les cellules MuStem que dans les myoblastes. En effet, il a été décrit qu'un abaissement du taux de glutathione peroxydase dans les MDSC à un taux équivalent à celui des myoblastes faisait perdre aux MDSC leur avantage régénératif une fois transplantés dans le muscle squelettique de souris *mdx* ou le muscle cardiaque d'un modèle murin d'infarctus du myocarde (Urish et al., 2009).

Nous pourrions également rechercher les taux des ALDH, qui correspondent à une famille d'enzymes qui détoxifient les produits aldéhydiques générés par les ROS, dans les cellules MuStem. En premier lieu, il paraît intéressant de rechercher l'expression protéique de l'Aldh1a1 puisque celle-ci est associée à l'activité ALDH dans les myoblastes humains (Jean et al., 2011). De plus, il est décrit que l'activité ALDH permet d'identifier une population de cellules dérivées du muscle squelettique ayant une résistance aux stress oxydatif et inflammatoire plus élevée ainsi qu'un fort potentiel myogénique (Jean et al., 2011; Vauchez et al., 2009; Vella et al., 2011b). L'activité ALDH est d'ailleurs considérée comme un marqueur qui pourrait permettre d'isoler rapidement des progéniteurs myogéniques présentant un potentiel pour la thérapie cellulaire. Positionner les cellules MuStem par rapport aux cellules ALDH<sup>+</sup> apparaît alors important.

De manière importante, nos résultats montrent qu'un abaissement de la teneur en O<sub>2</sub>, à 1% ou 5%, n'a pas d'effet délétère sur la capacité de survie des cellules MuStem. Elles présentent, en effet, un très faible taux de mortalité en condition hypoxique, équivalent à celui rencontré en condition normoxique. Les conditions hypoxiques ne semblent pas non plus modifier la morphologie des cellules MuStem. Ainsi, nous démontrons que les cellules MuStem sont capables de résister à des taux d'O<sub>2</sub> plus physiologiques, qu'elles sont susceptibles de rencontrer *in vivo* après transplantation. Nos résultats montrent également que l'hétérogénéité de prolifération entre les différents lots de cellules MuStem, observée en normoxie, est rapidement diminuée dès 3 jours après la mise en hypoxie des cellules MuStem. De plus, après 10 jours à 5% d'O<sub>2</sub>, nous n'observons pas de différence majeure de prolifération des cellules MuStem par rapport à la normoxie. Nous ne montrons pas d'augmentation importante de la prolifération pour tous les lots de cellules MuStem en condition hypoxique, contrairement à ce qui est décrit pour les CSM dans certaines études (Grayson et al., 2007; Hung et al., 2012; Dos Santos et al., 2010). Toutefois, nous devons considérer que les cellules MuStem sont cultivées dans un milieu de grade clinique, optimisé pour les cellules souches, et qui permet déjà d'obtenir de très bons taux de prolifération *in vitro* en condition normoxique. En vue d'obtenir de futurs lots cliniques, plus homogènes en termes de prolifération, nous pourrions optimiser notre protocole en cultivant les cellules MuStem à 5% d'O<sub>2</sub>.

Afin de compléter cette étude sur le comportement des cellules MuStem en condition hypoxique, nous pourrions également nous intéresser à l'impact de la teneur en O<sub>2</sub> sur la migration de ces dernières. En effet, plusieurs études décrivent que l'hypoxie permet d'augmenter la migration des CSM ainsi que leur mobilisation *in vivo* (Hung et al., 2012; Rochefort et al., 2006; Rosová et al., 2008). Il serait également intéressant d'étudier l'impact de la teneur en O<sub>2</sub> sur la capacité de différenciation myogénique *in vitro* des cellules MuStem. Plusieurs études semblent se contredire quant à l'effet de l'hypoxie sur la différenciation myogénique des cellules (Duguez et al., 2012; Liu et al., 2012b; Redshaw and Loughna, 2012). Liu et al. rapportent que des conditions hypoxiques favorisent la quiescence des myoblastes et inhibe leur différenciation myogénique *in vitro*, en augmentant notamment le pourcentage de cellules Pax7<sup>+</sup>/MyoD<sup>-</sup> (Liu et al., 2012b). A l'inverse, Redshaw et Loughna montrent que des concentrations en O<sub>2</sub> physiologiques (5% d'O<sub>2</sub>) favorisent la différenciation myogénique de cellules souches dérivées du muscle de porc *in vitro* (Redshaw and Loughna, 2012). La réponse cellulaire à l'hypoxie en matière de différenciation myogénique semble

donc dépendante de la population cellulaire étudiée. Les taux d'O<sub>2</sub> semblent cependant avoir un rôle sur les balances quiescence/activation, auto-renouvellement/différenciation.

Au niveau transcriptionnel, nous montrons une diminution de l'expression de HIF-1 $\alpha$  et de HIF-2 $\alpha$  dans les cellules MuStem après 5 jours à 5% ou 1% d'O<sub>2</sub>. Il peut tout d'abord paraître surprenant que les facteurs induits par l'hypoxie soient sous-exprimés à de telles teneurs en O<sub>2</sub>. Plusieurs études rapportent en effet, une augmentation de HIF au niveau transcriptionnel dans des cellules cultivées en hypoxie. Drela *et al.* montrent une augmentation des ARNm HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  dans des CSM de cordon ombilical cultivées à 5% d'O<sub>2</sub> pendant 2 à 4 semaines (Drela et al., 2014). Une autre étude montre également une augmentation d'expression de HIF-1 $\alpha$  dans des cellules ASC au passage 3 de culture à 2% d'O<sub>2</sub> (Choi et al., 2014). Cependant, une étude comparative de CSM dérivées de la moelle osseuse, du tissu adipeux, du liquide amniotique ou du sang de cordon a démontré que les effets de l'hypoxie n'étaient pas les mêmes en fonction de la source des cellules. Seules les CSM provenant de la moelle osseuse et du liquide amniotique montrent une surexpression de HIF-1 $\alpha$  après 3 et 7 jours à 1% d'O<sub>2</sub> (Dionigi et al., 2014). Les autres CSM ne montrent pas de changement d'expression de HIF-1 $\alpha$ . Une étude montre même une diminution importante du taux d'ARNm HIF-1 $\alpha$  dans les cellules endothéliales après 6 H à 1,5% d'O<sub>2</sub> qui se maintient à 24 H tandis que le taux de protéine augmente atteignant un pic après 3H pour diminuer lentement après (Chamboredon et al., 2011). Cette diminution d'expression de HIF-1 $\alpha$  est décrite comme étant médiée par les TTP (famille des tristetraprolines) qui interagissent directement avec la partie 3'UTR (Untranslated Region) de l'ARNm HIF-1 $\alpha$ . Aux vues de ces différentes études, les réponses cellulaires à l'hypoxie semblent dépendre des populations cellulaires étudiées, de leur origine et du temps d'exposition à l'hypoxie. Il semble important de compléter l'étude transcriptionnelle et de rechercher l'expression protéique de HIF-1 $\alpha$  dans les cellules MuStem exposées à 1% d'O<sub>2</sub>, notamment à des temps plus précoces.

Les différentes isoformes de HIF sont connues pour être hydroxylées puis transloquées au noyau pour y agir comme facteur transcriptionnel et contrôler l'expression de certains gènes tels que VEGFA (Okuyama et al., 2006). Nous montrons, malgré la diminution de l'ARNm HIF-1 $\alpha$ , une augmentation d'expression de VEGFA dans les cellules MuStem après 5 jours à 1% d'O<sub>2</sub>. Une régulation transcriptionnelle se met donc en place dès 5 jours d'hypoxie sévère et il serait intéressant de rechercher les variations d'expression de VEGF à des temps plus tardifs. Nos résultats montrent également une augmentation d'expression du facteur de pluripotence et d'auto-renouvellement KLF4 dans les cellules MuStem après 5 jours à 1%

d'O<sub>2</sub>. Ce résultat concorde avec les données de la bibliographie qui décrivent une augmentation des facteurs de pluripotence dans les cellules exposées à l'hypoxie (Choi et al., 2014; Hung et al., 2012; Zhou et al., 2014). Il semble intéressant d'étendre notre recherche à d'autres facteurs connus comme modulés par l'hypoxie et également impliqués dans l'auto-renouvellement des cellules souches. De même, nous pourrions rechercher les proportions de cellules MuStem dans les différentes phases du cycle cellulaire (G0, G1, S, G2/M) pour déterminer si l'hypoxie peut agir sur la régulation du cycle cellulaire, comme démontré par quelques études (Eliasson et al., 2010; Lees et al., 2008; Wierenga et al., 2014).

Nous avons cherché, par cette étude, à déterminer le comportement des cellules MuStem à des taux d'O<sub>2</sub> physiologiques mais aussi à évaluer si la culture des cellules MuStem en hypoxie pouvait constituer un intérêt dans l'optimisation du protocole de culture cellulaire, en vue de la préparation de futur lots cliniques. Les cellules MuStem sont d'ores et déjà cultivées dans un milieu de grade clinique qui a été optimisé et toute la caractérisation en cours repose sur ces conditions de culture. Nos résultats montrent que les cellules MuStem, dans leur milieu de culture, s'adaptent particulièrement bien à de faibles teneurs en O<sub>2</sub>. En effet, nous n'observons pas de variations majeures de morphologie et de prolifération cellulaire, plus particulièrement à 5% d'O<sub>2</sub>. Il me paraît cependant intéressant de cultiver les cellules MuStem à 5% d'O<sub>2</sub> afin de leur éviter un changement de teneur en O<sub>2</sub> au moment de la transplantation.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude montrent, avant tout, la résistance importante des cellules MuStem face aux stress oxydatif et hypoxique. Cette propriété des cellules MuStem est indispensable dans un contexte de transplantation où les cellules sont soumises à divers stress : mécaniques, inflammatoires, oxydatifs, hypoxiques. Elle pourrait permettre d'expliquer, en partie, leur survie et leur potentiel de régénération *in vivo* chez le chien GRMD (Rouger et al., 2011).



# Conclusions



L'utilisation d'une approche transcriptomique nous a permis d'approfondir les mécanismes physiopathologiques du chien GRMD mais également d'investiguer l'impact moléculaire de la thérapie cellulaire MuStem. Nous montrons que l'administration systémique de cellules MuStem agit, directement ou indirectement, sur différents processus biologiques et voies de signalisation. Plusieurs mois après la transplantation de cellules MuStem, nous montrons une modification d'expression de gènes impliqués dans la régénération, le complexe ubiquitine-protéasome ou encore le métabolisme, dans le muscle des chiens GRMD traités. De façon concomitante, nous montrons que la transplantation de cellules MuStem permet de corriger l'expression tissulaire des miR-1, miR-133 et miR-486 chez les chiens GRMD.

Les résultats obtenus nous ouvrent des perspectives quant à l'identification de marqueurs thérapeutiques, tissulaires ou bien circulants. Les cibles moléculaires que nous identifions pourront à l'avenir être recherchées chez les chiens GRMD des nouvelles cohortes, où une étude cinétique pourra être effectuée.

L'UMR 703 travaille actuellement sur le transfert en clinique du protocole de production de lots de cellules MuStem humaines. Les cellules MuStem, déjà cultivées dans un milieu de grade clinique, font l'objet d'un vaste programme de qualification afin de déterminer si elles peuvent ou non être présentées comme produit thérapeutique pour la mise en place d'un essai clinique chez les patients atteints de DMD. La présente étude participe à approfondir leur caractérisation phénotypique. Nous démontrons que les cellules MuStem humaines expriment les facteurs de transcription Klf4, Nanog et Oct3-4, importants pour l'auto-renouvellement et la pluripotence des cellules souches. Nous révélons également une capacité d'adaptation des cellules MuStem aux changements environnementaux. Les cellules MuStem, dans leurs conditions de culture, présentent une résistance à un stress oxydatif induit *in vitro* plus importante que les myoblastes. De plus, un abaissement de la teneur en O<sub>2</sub> n'affecte pas de façon importante la survie, la prolifération et la morphologie des cellules MuStem. Nous montrons ainsi que les cellules MuStem peuvent s'adapter à des teneurs en O<sub>2</sub> qu'elles sont susceptibles de rencontrer *in vivo* après transplantation. Nous soulevons l'intérêt de cultiver les cellules MuStem à des taux d'O<sub>2</sub> plus physiologiques avant leur transplantation. La résistance des cellules MuStem face aux stress oxydatifs et hypoxiques pourrait permettre d'expliquer, en partie, leur survie post-transplantation et leur potentiel de régénération démontrés *in vivo* chez le chien GRMD. Sur la base de ces résultats qu'il conviendra de compléter, il apparaît important d'évaluer les conséquences de ces différentes adaptations sur

le comportement myogénique *in vitro* mais aussi *in vivo* des cellules MuStem, de sorte de pouvoir présenter un protocole de production de lots cliniques le plus favorable possible.

# Références



Adams, V., Mangner, N., Gasch, A., Krohne, C., Gielen, S., Hirner, S., Thierse, H.-J., Witt, C.C., Linke, A., Schuler, G., et al. (2008). Induction of MuRF1 is essential for TNF-alpha-induced loss of muscle function in mice. *J. Mol. Biol.* *384*, 48–59.

Adkin, C.F., Meloni, P.L., Fletcher, S., Adams, A.M., Muntoni, F., Wong, B., and Wilton, S.D. (2012). Multiple exon skipping strategies to by-pass dystrophin mutations. *Neuromuscul. Disord.* *22*, 297–305.

Ahn, A.H., and Kunkel, L.M. (1993). The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat. Genet.* *3*, 283–291.

Alexander, M.S., Casar, J.C., Motohashi, N., Myers, J. a, Eisenberg, I., Gonzalez, R.T., Estrella, E. a, Kang, P.B., Kawahara, G., and Kunkel, L.M. (2011). Regulation of DMD pathology by an ankyrin-encoded miRNA. *Skelet. Muscle* *1*, 27.

Alexander, M.S., Casar, J.C., Motohashi, N., Vieira, N.M., Eisenberg, I., Marshall, J.L., Gasperini, M.J., Lek, A., Myers, J.A., Estrella, E.A., et al. (2014). MicroRNA-486-dependent modulation of DOCK3/PTEN/AKT signaling pathways improves muscular dystrophy-associated symptoms. *J. Clin. Invest.* *124*, 2651–2667.

Allen, D.G., and Whitehead, N.P. (2011). Duchenne muscular dystrophy--what causes the increased membrane permeability in skeletal muscle? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *43*, 290–294.

Ambrósio, C.E., Valadares, M.C., Zucconi, E., Cabral, R., Pearson, P.L., Gaiad, T.P., Canovas, M., Vainzof, M., Miglino, M.A., and Zatz, M. (2008). Ringo, a Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dog with absent dystrophin but normal strength. *Neuromuscul. Disord.* *18*, 892–893.

Angelini, C., Fanin, M., Freda, M.P., Martinello, F., Miorin, M., Melacini, P., Siciliano, G., Pegoraro, E., Rosa, M., and Danieli, G. a (1996). Prognostic factors in mild dystrophinopathies. *J. Neurol. Sci.* *142*, 70–78.

De Angelis, L., Berghella, L., Coletta, M., Lattanzi, L., Zanchi, M., Cusella-De Angelis, M.G., Ponzetto, C., and Cossu, G. (1999). Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J. Cell Biol.* *147*, 869–878.

Aoki, Y., Yokota, T., Nagata, T., Nakamura, A., Tanihata, J., Saito, T., Duguez, S.M.R., Nagaraju, K., Hoffman, E.P., Partridge, T., et al. (2012). Bodywide skipping of exons 45-55

in dystrophic mdx52 mice by systemic antisense delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 13763–13768.

Aoki, Y., Yokota, T., and Wood, M.J. a (2013). Development of multiexon skipping antisense oligonucleotide therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Biomed Res. Int.* *2013*, 402369.

Araujo, K.P.C., Bonuccelli, G., Duarte, C.N., Gaiad, T.P., Moreira, D.F., Feder, D., Belizario, J.E., Miglino, M. a, Lisanti, M.P., and Ambrosio, C.E. (2013). Bortezomib (PS-341) treatment decreases inflammation and partially rescues the expression of the dystrophin-glycoprotein complex in GRMD dogs. *PLoS One* *8*, e61367.

Arroyo, J.D., Chevillet, J.R., Kroh, E.M., Ruf, I.K., Pritchard, C.C., Gibson, D.F., Mitchell, P.S., Bennett, C.F., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Stirewalt, D.L., et al. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 5003–5008.

Arsic, N., Zacchigna, S., Zentilin, L., Ramirez-Correa, G., Pattarini, L., Salvi, A., Sinagra, G., and Giacca, M. (2004). Vascular endothelial growth factor stimulates skeletal muscle regeneration in vivo. *Mol. Ther.* *10*, 844–854.

Arsic, N., Mamaeva, D., Lamb, N.J., and Fernandez, A. (2008). Muscle-derived stem cells isolated as non-adherent population give rise to cardiac, skeletal muscle and neural lineages. *Exp. Cell Res.* *314*, 1266–1280.

Asakura, A., Seale, P., Girgis-Gabardo, A., and Rudnicki, M.A. (2002). Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* *159*, 123–134.

Augello, A., Kurth, T.B., and De Bari, C. (2010). Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur. Cell. Mater.* *20*, 121–133.

Bachrach, E., Perez, A.L., Choi, Y.-H., Illigens, B.M.W., Jun, S.J., del Nido, P., McGowan, F.X., Li, S., Flint, A., Chamberlain, J., et al. (2006). Muscle engraftment of myogenic progenitor cells following intraarterial transplantation. *Muscle Nerve* *34*, 44–52.

Bakay, M., Zhao, P., Chen, J., and Hoffman, E.P. (2002). A web-accessible complete transcriptome of normal human and DMD muscle. *Neuromuscul. Disord.* *12 Suppl 1*, S125–41.

Barberi, T., Bradbury, M., Dincer, Z., Panagiotakos, G., Socci, N.D., and Studer, L. (2007). Derivation of engraftable skeletal myoblasts from human embryonic stem cells. *Nat. Med.* *13*, 642–648.

Baron, D., Magot, A., Ramstein, G., Steenman, M., Fayet, G., Chevalier, C., Jourdon, P., Houlgatte, R., Savagner, F., and Pereon, Y. (2011). Immune response and mitochondrial metabolism are commonly deregulated in DMD and aging skeletal muscle. *PLoS One* *6*, e26952.

Barthélémy, I., Uriarte, A., Drougard, C., Unterfinger, Y., Thibaud, J.-L., and Blot, S. (2012). Effects of an immunosuppressive treatment in the GRMD dog model of Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* *7*, e48478.

Bassett, D.I., Bryson-Richardson, R.J., Daggett, D.F., Gautier, P., Keenan, D.G., and Currie, P.D. (2003). Dystrophin is required for the formation of stable muscle attachments in the zebrafish embryo. *Development* *130*, 5851–5860.

Becker, P.E., and Kiener, F. (1955). [A new x-chromosomal muscular dystrophy]. *Arch. Psychiatr. Nervenkr. Z. Gesamte Neurol. Psychiatr.* *193*, 427–448.

Beenakker, E.A.C., de Vries, J., Fock, J.M., van Tol, M., Brouwer, O.F., Maurits, N.M., and van der Hoeven, J.H. (2002). Quantitative assessment of calf circumference in Duchenne muscular dystrophy patients. *Neuromuscul. Disord.* *12*, 639–642.

Beggs, a H., Koenig, M., Boyce, F.M., and Kunkel, L.M. (1990). Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum. Genet.* *86*, 45–48.

Belicchi, M., Erratico, S., Razini, P., Meregalli, M., Cattaneo, A., Jacchetti, E., Farini, A., Villa, C., Bresolin, N., Porretti, L., et al. (2010). Ex vivo expansion of human circulating myogenic progenitors on cluster-assembled nanostructured TiO<sub>2</sub>. *Biomaterials* *31*, 5385–5396.

Benchouir, R., Meregalli, M., Farini, A., D'Antona, G., Belicchi, M., Goyenvalle, A., Battistelli, M., Bresolin, N., Bottinelli, R., Garcia, L., et al. (2007). Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Cell Stem Cell* *1*, 646–657.

Besson, V., Smeriglio, P., Wegener, A., Relaix, F., Nait Oumesmar, B., Sassoon, D.A., and Marazzi, G. (2011). PW1 gene/paternally expressed gene 3 (PW1/Peg3) identifies

multiple adult stem and progenitor cell populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 11470–11475.

Bessou, C., Giuglia, J.-B., Franks, C.J., Holden-Dye, L., and Ségalat, L. (1998). Mutations in the *Caenorhabditis elegans* dystrophin-like gene *dys-1* lead to hyperactivity and suggest a link with cholinergic transmission. *Neurogenetics* *2*, 61–72.

Bhagavati, S., and Xu, W. (2005). Generation of skeletal muscle from transplanted embryonic stem cells in dystrophic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *333*, 644–649.

Biggar, W.D., Gingras, M., Fehlings, D.L., Harris, V.A., and Steele, C.A. (2001). Deflazacort treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J. Pediatr.* *138*, 45–50.

Biggar, W.D., Politano, L., Harris, V.A., Passamano, L., Vajsar, J., Alman, B., Palladino, A., Comi, L.I., and Nigro, G. (2004). Deflazacort in Duchenne muscular dystrophy: a comparison of two different protocols. *Neuromuscul. Disord.* *14*, 476–482.

Bish, L.T., Yarcoan, M., Sleeper, M.M., Gazzara, J.A., Morine, K.J., Acosta, P., Barton, E.R., and Sweeney, H.L. (2011). Chronic losartan administration reduces mortality and preserves cardiac but not skeletal muscle function in dystrophic mice. *PLoS One* *6*, e20856.

Bogdanovich, S., Krag, T.O.B., Barton, E.R., Morris, L.D., Whittemore, L.-A., Ahima, R.S., and Khurana, T.S. (2002). Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* *420*, 418–421.

Boonen, K.J.M., and Post, M.J. (2008). The muscle stem cell niche: regulation of satellite cells during regeneration. *Tissue Eng. Part B. Rev.* *14*, 419–431.

Bosch, P., Musgrave, D., Ghivizzani, S., Latterman, C., Day, C.S., and Huard, J. The efficiency of muscle-derived cell-mediated bone formation. *Cell Transplant.* *9*, 463–470.

Böttinger, E.P., Factor, V.M., Tsang, M.L., Weatherbee, J.A., Kopp, J.B., Qian, S.W., Wakefield, L.M., Roberts, A.B., Thorgeirsson, S.S., and Sporn, M.B. (1996). The recombinant proregion of transforming growth factor beta1 (latency-associated peptide) inhibits active transforming growth factor beta1 in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 5877–5882.

Boyce, F.M., Beggs, a H., Feener, C., and Kunkel, L.M. (1991). Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 1276–1280.

Briggs, D., and Morgan, J.E. (2013). Recent progress in satellite cell/myoblast engraftment -- relevance for therapy. *FEBS J.* 280, 4281–4293.

Ten Broek, R.W., Grefte, S., and Von den Hoff, J.W. (2010). Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration. *J. Cell. Physiol.* 224, 7–16.

Brown, R.H. (1997). Dystrophin-associated proteins and the muscular dystrophies. *Annu. Rev. Med.* 48, 457–466.

Brzoska, E., Kowalewska, M., Markowska-Zagrajek, A., Kowalski, K., Archacka, K., Zimowska, M., Grabowska, I., Czerwińska, A.M., Czarnecka-Góra, M., Stremińska, W., et al. (2012). Sdf-1 (CXCL12) improves skeletal muscle regeneration via the mobilisation of Cxcr4 and CD34 expressing cells. *Biol. Cell* 104, 722–737.

Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A., and Moore, K.J. (1984). X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 1189–1192.

Burkin, D.J., Wallace, G.Q., Nicol, K.J., Kaufman, D.J., and Kaufman, S.J. (2001). Enhanced expression of the alpha 7 beta 1 integrin reduces muscular dystrophy and restores viability in dystrophic mice. *J. Cell Biol.* 152, 1207–1218.

Cacchiarelli, D., Martone, J., Girardi, E., Cesana, M., Incitti, T., Morlando, M., Nicoletti, C., Santini, T., Sthandier, O., Barberi, L., et al. (2010). MicroRNAs involved in molecular circuitries relevant for the Duchenne muscular dystrophy pathogenesis are controlled by the dystrophin/nNOS pathway. *Cell Metab.* 12, 341–351.

Cacchiarelli, D., Legnini, I., Martone, J., Cazzella, V., D'Amico, A., Bertini, E., and Bozzoni, I. (2011). miRNAs as serum biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol. Med.* 3, 258–265.

Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10, 1957–1966.

Camargo, F.D., Green, R., Capetanaki, Y., Jackson, K.A., Goodell, M.A., and Capetanaki, Y. (2003). Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat. Med.* 9, 1520–1527.

Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9, 641–650.

Capote, J., DiFranco, M., and Vergara, J.L. (2010). Excitation-contraction coupling alterations in mdx and utrophin/dystrophin double knockout mice: a comparative study. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298, C1077–86.

Cardinali, B., Castellani, L., Fasanaro, P., Basso, A., Alemà, S., Martelli, F., and Falcone, G. (2009). MicroRNA-221 and microRNA-222 modulate differentiation and maturation of skeletal muscle cells. *PLoS One* 4, e7607.

Carpenter, J.L., Hoffman, E.P., Romanul, F.C., Kunkel, L.M., Rosales, R.K., Ma, N.S., Dasbach, J.J., Rae, J.F., Moore, F.M., and McAfee, M.B. (1989). Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency. *Am. J. Pathol.* 135, 909–919.

Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N., and Caskey, C.T. (1988). Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16, 11141–11156.

Chamboredon, S., Ciais, D., Desroches-Castan, A., Savi, P., Bono, F., Feige, J.-J., and Cherradi, N. (2011). Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  mRNA: a new target for destabilization by tristetraprolin in endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* 22, 3366–3378.

Chandrasekharan, K., Yoon, J.H., Xu, Y., deVries, S., Camboni, M., Janssen, P.M.L., Varki, A., and Martin, P.T. (2010). A human-specific deletion in mouse Cmah increases disease severity in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* 2, 42ra54.

Chang, H.H., Hemberg, M., Barahona, M., Ingber, D.E., and Huang, S. (2008). Transcriptome-wide noise controls lineage choice in mammalian progenitor cells. *Nature* 453, 544–547.

Chazaud, B., Sonnet, C., Lafuste, P., Bassez, G., Rimaniol, A.-C., Poron, F., Authier, F.-J., Dreyfus, P.A., and Gherardi, R.K. (2003). Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J. Cell Biol.* 163, 1133–1143.

Chazaud, B., Brigitte, M., Yacoub-Youssef, H., Arnold, L., Gherardi, R., Sonnet, C., Lafuste, P., and Chretien, F. (2009). Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 37, 18–22.

Chen, J.-F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., Conlon, F.L., and Wang, D.-Z. (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat. Genet.* 38, 228–233.

Chen, J.-F., Tao, Y., Li, J., Deng, Z., Yan, Z., Xiao, X., and Wang, D.-Z. (2010). microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J. Cell Biol.* 190, 867–879.

Chen, W.-J., Lin, Q.-F., Zhang, Q.-J., He, J., Liu, X.-Y., Lin, M.-T., Murong, S.-X., Liou, C.-W., and Wang, N. (2013). Molecular analysis of the dystrophin gene in 407 Chinese patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy by the combination of multiplex ligation-dependent probe amplification and Sanger sequencing. *Clin. Chim. Acta.* 423, 35–38.

Chen, Y.W., Zhao, P., Borup, R., and Hoffman, E.P. (2000). Expression profiling in the muscular dystrophies: identification of novel aspects of molecular pathophysiology. *J. Cell Biol.* 151, 1321–1336.

Chen, Y.-W., Nagaraju, K., Bakay, M., McIntyre, O., Rawat, R., Shi, R., and Hoffman, E.P. (2005). Early onset of inflammation and later involvement of TGFbeta in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 65, 826–834.

Chetboul, V., Carlos, C., Blot, S., Thibaud, J.L., Escriou, C., Tissier, R., Retortillo, J.L., and Pouchelon, J.-L. (2004). Tissue Doppler assessment of diastolic and systolic alterations of radial and longitudinal left ventricular motions in Golden Retrievers during the preclinical phase of cardiomyopathy associated with muscular dystrophy. *Am. J. Vet. Res.* 65, 1335–1341.

Chevillet, J.R., Kang, Q., Ruf, I.K., Briggs, H.A., Vojtech, L.N., Hughes, S.M., Cheng, H.H., Arroyo, J.D., Meredith, E.K., Gallichotte, E.N., et al. (2014). Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

Chirieleison, S.M., Feduska, J.M., Schugar, R.C., Askew, Y., and Deasy, B.M. (2012). Human muscle-derived cell populations isolated by differential adhesion rates: phenotype and contribution to skeletal muscle regeneration in Mdx/SCID mice. *Tissue Eng. Part A* 18, 232–241.

Choi, J.R., Pinguan-Murphy, B., Wan Abas, W.A.B., Noor Azmi, M.A., Omar, S.Z., Chua, K.H., and Wan Safwani, W.K.Z. (2014). Impact of Low Oxygen Tension on Stemness,

Proliferation and Differentiation Potential of Human Adipose-derived Stem Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2.

Christov, C., Chrétien, F., Abou-Khalil, R., Bassez, G., Vallet, G., Authier, F.-J., Bassaglia, Y., Shinin, V., Tajbakhsh, S., Chazaud, B., et al. (2007). Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol. Biol. Cell* 18, 1397–1409.

Cirak, S., Arechavala-Gomez, V., Guglieri, M., Feng, L., Torelli, S., Anthony, K., Abbs, S., Garralda, M.E., Bourke, J., Wells, D.J., et al. (2011). Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet* 378, 595–605.

Collins, C.A., Olsen, I., Zammit, P.S., Heslop, L., Petrie, A., Partridge, T.A., and Morgan, J.E. (2005). Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 122, 289–301.

Cooper, B.J., Winand, N.J., Stedman, H., Valentine, B.A., Hoffman, E.P., Kunkel, L.M., Scott, M.-O., Fischbeck, K.H., Kornegay, J.N., Avery, R.J., et al. (1988). The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature* 334, 154–156.

Corbel, S.Y., Lee, A., Yi, L., Duenas, J., Brazelton, T.R., Blau, H.M., and Rossi, F.M. V (2003). Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. *Nat. Med.* 9, 1528–1532.

Cossu, G., Kelly, R., Tajbakhsh, S., Di Donna, S., Vivarelli, E., and Buckingham, M. (1996). Activation of different myogenic pathways: myf-5 is induced by the neural tube and MyoD by the dorsal ectoderm in mouse paraxial mesoderm. *Development* 122, 429–437.

Coulton, G.R., Curtin, N.A., Morgan, J.E., and Partridge, T.A. (1988). The mdx mouse skeletal muscle myopathy: II. Contractile properties. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 14, 299–314.

Covello, K.L., Kehler, J., Yu, H., Gordan, J.D., Arsham, A.M., Hu, C.-J., Labosky, P.A., Simon, M.C., and Keith, B. (2006). HIF-2 $\alpha$  regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev.* 20, 557–570.

Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., et al. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 3, 301–313.

Crisan, M., Corselli, M., Chen, C., and Péault, B. (2011). Multilineage stem cells in the adult A perivascular legacy? *Organogenesis* 7, 101–104.

Crist, C.G., Montarras, D., Pallafacchina, G., Rocancourt, D., Cumano, A., Conway, S.J., and Buckingham, M. (2009). Muscle stem cell behavior is modified by microRNA-27 regulation of Pax3 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 13383–13387.

Csete, M. (2005). Oxygen in the cultivation of stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1049, 1–8.

Cynthia Martin, F., Hiller, M., Spitali, P., Oonk, S., Dalebout, H., Palmblad, M., Chaouch, A., Guglieri, M., Straub, V., Lochmüller, H., et al. (2014). Fibronectin is a serum biomarker for Duchenne muscular dystrophy. *Proteomics. Clin. Appl.* 8, 269–278.

Darabi, R., Baik, J., Clee, M., Kyba, M., Tupler, R., and Perlingeiro, R.C.R. (2009). Engraftment of embryonic stem cell-derived myogenic progenitors in a dominant model of muscular dystrophy. *Exp. Neurol.* 220, 212–216.

Darabi, R., Santos, F.N.C., Filareto, A., Pan, W., Koene, R., Rudnicki, M.A., Kyba, M., and Perlingeiro, R.C.R. (2011). Assessment of the myogenic stem cell compartment following transplantation of Pax3/Pax7-induced embryonic stem cell-derived progenitors. *Stem Cells* 29, 777–790.

Darabi, R., Arpke, R.W., Irion, S., Dimos, J.T., Grskovic, M., Kyba, M., and Perlingeiro, R.C.R. (2012). Human ES- and iPS-derived myogenic progenitors restore DYSTROPHIN and improve contractility upon transplantation in dystrophic mice. *Cell Stem Cell* 10, 610–619.

Daubas, P., and Buckingham, M.E. (2013). Direct molecular regulation of the myogenic determination gene *Myf5* by Pax3, with modulation by Six1/4 factors, is exemplified by the -111kb-*Myf5* enhancer. *Dev. Biol.* 376, 236–244.

Deasy, B.M., Jankowski, R.J., and Huard, J. (2001). Muscle-derived stem cells: characterization and potential for cell-mediated therapy. *Blood Cells. Mol. Dis.* 27, 924–933.

Deasy, B.M., Gharaibeh, B.M., Pollett, J.B., Jones, M.M., Lucas, M.A., Kanda, Y., and Huard, J. (2005). Long-term self-renewal of postnatal muscle-derived stem cells. *Mol. Biol. Cell* 16, 3323–3333.

Deconinck, N., and Dan, B. (2007). Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr. Neurol.* 36, 1–7.

Deconinck, a E., Rafael, J. a, Skinner, J. a, Brown, S.C., Potter, a C., Metzinger, L., Watt, D.J., Dickson, J.G., Tinsley, J.M., and Davies, K.E. (1997). Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* *90*, 717–727.

Dell’Agnola, C., Wang, Z., Storb, R., Tapscott, S.J., Kuhr, C.S., Hauschka, S.D., Lee, R.S., Sale, G.E., Zellmer, E., Gisburne, S., et al. (2004). Hematopoietic stem cell transplantation does not restore dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy dogs. *Blood* *104*, 4311–4318.

Dellavalle, A., Sampaolesi, M., Tonlorenzi, R., Tagliafico, E., Sacchetti, B., Perani, L., Innocenzi, A., Galvez, B.G., Messina, G., Morosetti, R., et al. (2007). Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat. Cell Biol.* *9*, 255–267.

Dellavalle, A., Maroli, G., Covarello, D., Azzoni, E., Innocenzi, A., Perani, L., Antonini, S., Sambasivan, R., Brunelli, S., Tajbakhsh, S., et al. (2011). Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells. *Nat. Commun.* *2*, 499.

Delorme, B., Ringe, J., Gallay, N., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., Jorgensen, C., Rosset, P., Sensebé, L., Layrolle, P., Häupl, T., et al. (2008). Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood* *111*, 2631–2635.

Dent, K.M., Dunn, D.M., von Niederhausern, A.C., Aoyagi, A.T., Kerr, L., Bromberg, M.B., Hart, K.J., Tuohy, T., White, S., den Dunnen, J.T., et al. (2005). Improved molecular diagnosis of dystrophinopathies in an unselected clinical cohort. *Am. J. Med. Genet. A* *134*, 295–298.

Dernbach, E., Urbich, C., Brandes, R.P., Hofmann, W.K., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2004). Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress. *Blood* *104*, 3591–3597.

Dey, B.K., Gagan, J., and Dutta, A. (2011). miR-206 and -486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 203–214.

Dezawa, M., Ishikawa, H., Itokazu, Y., Yoshihara, T., Hoshino, M., Takeda, S., Ide, C., and Nabeshima, Y. (2005). Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science* *309*, 314–317.

Dionigi, B., Ahmed, A., Pennington, E.C., Zurakowski, D., and Fauza, D.O. (2014). A comparative analysis of human mesenchymal stem cell response to hypoxia in vitro: Implications to translational strategies. *J. Pediatr. Surg.* *49*, 915–918.

Doran, P., Dowling, P., Lohan, J., McDonnell, K., Poetsch, S., and Ohlendieck, K. (2004). Subproteomics analysis of Ca<sup>+</sup>-binding proteins demonstrates decreased calsequestrin expression in dystrophic mouse skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* *271*, 3943–3952.

Doran, P., Dowling, P., Donoghue, P., Buffini, M., and Ohlendieck, K. (2006). Reduced expression of regucalcin in young and aged mdx diaphragm indicates abnormal cytosolic calcium handling in dystrophin-deficient muscle. *Biochim. Biophys. Acta* *1764*, 773–785.

Dowling, P., Holland, A., and Ohlendieck, K. (2014). Mass Spectrometry-Based Identification of Muscle-Associated and Muscle-Derived Proteomic Biomarkers of Dystrophinopathies. *J. Neuromuscul. Dis.* *1*, 15–40.

Doyle, M.J., Zhou, S., Tanaka, K.K., Pisconti, A., Farina, N.H., Sorrentino, B.P., and Olwin, B.B. (2011). Abcg2 labels multiple cell types in skeletal muscle and participates in muscle regeneration. *J. Cell Biol.* *195*, 147–163.

Drela, K., Sarnowska, A., Siedlecka, P., Szablowska-Gadomska, I., Wielgos, M., Jurga, M., Lukomska, B., and Domanska-Janik, K. (2014). Low oxygen atmosphere facilitates proliferation and maintains undifferentiated state of umbilical cord mesenchymal stem cells in an hypoxia inducible factor-dependent manner. *Cytotherapy* *16*, 881–892.

Drowley, L., Okada, M., Beckman, S., Vella, J., Keller, B., Tobita, K., and Huard, J. (2010). Cellular antioxidant levels influence muscle stem cell therapy. *Mol. Ther.* *18*, 1865–1873.

Duguez, S., Duddy, W.J., Gnocchi, V., Bowe, J., Dadgar, S., and Partridge, T. a (2012). Atmospheric oxygen tension slows myoblast proliferation via mitochondrial activation. *PLoS One* *7*, e43853.

Dumonceaux, J., Marie, S., Beley, C., Trollet, C., Vignaud, A., Ferry, A., Butler-Browne, G., and Garcia, L. (2010). Combination of myostatin pathway interference and dystrophin rescue enhances tetanic and specific force in dystrophic mdx mice. *Mol. Ther.* *18*, 881–887.

Eisenberg, I., Eran, A., Nishino, I., Moggio, M., Lamperti, C., Amato, A.A., Lidov, H.G., Kang, P.B., North, K.N., Mitrani-Rosenbaum, S., et al. (2007). Distinctive patterns of

microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 17016–17021.

Eisenberg, I., Alexander, M.S., and Kunkel, L.M. (2009). miRNAs in normal and diseased skeletal muscle. *J. Cell. Mol. Med.* *13*, 2–11.

Eliasson, P., Rehn, M., Hammar, P., Larsson, P., Sirenko, O., Flippin, L.A., Cammenga, J., and Jönsson, J.-I. (2010). Hypoxia mediates low cell-cycle activity and increases the proportion of long-term-reconstituting hematopoietic stem cells during in vitro culture. *Exp. Hematol.* *38*, 301–310.e2.

Emery, A.E. (1989). Clinical and molecular studies in Duchenne muscular dystrophy. *Prog. Clin. Biol. Res.* *306*, 15–28.

Emery, A.E. (1991). Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul. Disord.* *1*, 19–29.

Emery, A.E.H. (2002). The muscular dystrophies. *Lancet* *359*, 687–695.

Erriquez, D., Perini, G., and Ferlini, A. (2013). Non-coding RNAs in muscle dystrophies. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 19681–19704.

Ervasti, J.M., and Campbell, K.P. (1991). Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* *66*, 1121–1131.

Escobar, D.M., Hache, L.P., Clemens, P.R., Cnaan, A., McDonald, C.M., Viswanathan, V., Kornberg, A.J., Bertorini, T.E., Nevo, Y., Lotze, T., et al. (2011). Randomized, blinded trial of weekend vs daily prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* *77*, 444–452.

Fan, Y., Maley, M., Beilharz, M., and Grounds, M. (1996). Rapid death of injected myoblasts in myoblast transfer therapy. *Muscle Nerve* *19*, 853–860.

Feron, M., Guevel, L., Rouger, K., Dubreil, L., Arnaud, M.-C., Ledevin, M., Megeney, L., Cherel, Y., and Sakanyan, V. (2009). PTEN contributes to profound PI3K/Akt signaling pathway deregulation in dystrophin-deficient dog muscle. *Am. J. Pathol.* *174*, 1459–1470.

Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., and Mavilio, F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* *279*, 1528–1530.

Fiaschi, T., Cirelli, D., Comito, G., Gelmini, S., Ramponi, G., Serio, M., and Chiarugi, P. (2009). Globular adiponectin induces differentiation and fusion of skeletal muscle cells. *Cell Res.* *19*, 584–597.

Fiaschi, T., Tedesco, F.S., Giannoni, E., Diaz-manera, J., Parri, M., Cossu, G., Chiarugi, P., and Iim, M. (2010). Globular Adiponectin as a Complete Mesoangioblast Regulator : Role in Proliferation , Survival , Motility , and Skeletal Muscle Differentiation. *21*, 848–859.

Fiaschi, T., Giannoni, E., Taddei, M.L., and Chiarugi, P. (2012). Globular adiponectin activates motility and regenerative traits of muscle satellite cells. *PLoS One* *7*, e34782.

Finkel, R.S., Flanigan, K.M., Wong, B., Bönnemann, C., Sampson, J., Sweeney, H.L., Reha, A., Northcutt, V.J., Elfring, G., Barth, J., et al. (2013). Phase 2a study of ataluren-mediated dystrophin production in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* *8*, e81302.

Flanigan, K.M., Voit, T., Rosales, X.Q., Servais, L., Kraus, J.E., Wardell, C., Morgan, A., Dorricott, S., Nakielny, J., Quarcoo, N., et al. (2014). Pharmacokinetics and safety of single doses of drisapersen in non-ambulant subjects with Duchenne muscular dystrophy: results of a double-blind randomized clinical trial. *Neuromuscul. Disord.* *24*, 16–24.

Forristal, C.E., Wright, K.L., Hanley, N.A., Oreffo, R.O.C., and Houghton, F.D. (2010). Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reproduction* *139*, 85–97.

Franco, A., and Lansman, J.B. (1990). Calcium entry through stretch-inactivated ion channels in mdx myotubes. *Nature* *344*, 670–673.

Fukada, S., Uezumi, A., Ikemoto, M., Masuda, S., Segawa, M., Tanimura, N., Yamamoto, H., Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S. (2007). Molecular signature of quiescent satellite cells in adult skeletal muscle. *Stem Cells* *25*, 2448–2459.

Galvez, B.G., Sampaolesi, M., Brunelli, S., Covarello, D., Gavina, M., Rossi, B., Constantin, G., Costantin, G., Torrente, Y., and Cossu, G. (2006). Complete repair of dystrophic skeletal muscle by mesoangioblasts with enhanced migration ability. *J. Cell Biol.* *174*, 231–243.

Gang, E.J., Bosnakovski, D., Figueiredo, C. a, Visser, J.W., and Perlingeiro, R.C.R. (2007). SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* *109*, 1743–1751.

Gaschen, F.P., Hoffman, E.P., Gorospe, J.R., Uhl, E.W., Senior, D.F., Cardinet, G.H., and Pearce, L.K. (1992). Dystrophin deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats. *J. Neurol. Sci.* *110*, 149–159.

Ge, Y., Sun, Y., and Chen, J. (2011). IGF-II is regulated by microRNA-125b in skeletal myogenesis. *J. Cell Biol.* *192*, 69–81.

Germani, A., Di Carlo, A., Mangoni, A., Straino, S., Giacinti, C., Turrini, P., Biglioli, P., and Capogrossi, M.C. (2003). Vascular endothelial growth factor modulates skeletal myoblast function. *Am. J. Pathol.* *163*, 1417–1428.

Gieseler, K., Grisoni, K., and Ségalat, L. (2000). Genetic suppression of phenotypes arising from mutations in dystrophin-related genes in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* *10*, 1092–1097.

Gilbert, P.M., Havenstrite, K.L., Magnusson, K.E.G., Sacco, A., Leonardi, N.A., Kraft, P., Nguyen, N.K., Thrun, S., Lutolf, M.P., and Blau, H.M. (2010). Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture. *Science* *329*, 1078–1081.

Goemans, N., and Buyse, G. (2014). Current treatment and management of dystrophinopathies. *Curr. Treat. Options Neurol.* *16*, 287.

Goljanek-Whysall, K., Pais, H., Rathjen, T., Sweetman, D., Dalmay, T., and Münsterberg, A. (2012). Regulation of multiple target genes by miR-1 and miR-206 is pivotal for C2C12 myoblast differentiation. *J. Cell Sci.* *125*, 3590–3600.

Golumbek, P.T., Keeling, R.M., and Connolly, A.M. (2007). RAG2 gene knockout in mice causes fatigue. *Muscle Nerve* *36*, 471–476.

Goudenege, S., Lebel, C., Huot, N.B., Dufour, C., Fujii, I., Gekas, J., Rousseau, J., and Tremblay, J.P. (2012). Myoblasts derived from normal hESCs and dystrophic hiPSCs efficiently fuse with existing muscle fibers following transplantation. *Mol. Ther.* *20*, 2153–2167.

Govoni, A., Magri, F., Brajkovic, S., Zanetta, C., Faravelli, I., Corti, S., Bresolin, N., and Comi, G.P. (2013). Ongoing therapeutic trials and outcome measures for Duchenne muscular dystrophy. *Cell. Mol. Life Sci.*

Grady, R.M., Teng, H., Nichol, M.C., Cunningham, J.C., Wilkinson, R.S., and Sanes, J.R. (1997). Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* *90*, 729–738.

Grady, R.M., Grange, R.W., Lau, K.S., Maimone, M.M., Nichol, M.C., Stull, J.T., and Sanes, J.R. (1999). Role for alpha-dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin-dependent muscular dystrophies. *Nat. Cell Biol.* *1*, 215–220.

Granchelli, J.A., Pollina, C., and Hudecki, M.S. (2000). Pre-clinical screening of drugs using the mdx mouse. *Neuromuscul. Disord.* *10*, 235–239.

Le Grand, F., Grifone, R., Mourikis, P., Houbron, C., Gigaud, C., Pujol, J., Maillet, M., Pagès, G., Rudnicki, M., Tajbakhsh, S., et al. (2012). Six1 regulates stem cell repair potential and self-renewal during skeletal muscle regeneration. *J. Cell Biol.* *198*, 815–832.

Grayson, W.L., Zhao, F., Bunnell, B., and Ma, T. (2007). Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *358*, 948–953.

Greco, S., De Simone, M., Colussi, C., Zaccagnini, G., Fasanaro, P., Pescatori, M., Cardani, R., Perbellini, R., Isaia, E., Sale, P., et al. (2009). Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. *FASEB J.* *23*, 3335–3346.

Greenbaum, A.R., Etherington, P.J., Manek, S., O'Hare, D., Parker, K.H., Green, C.J., Pepper, J.R., and Winlove, C.P. (1997). Measurements of oxygenation and perfusion in skeletal muscle using multiple microelectrodes. *J. Muscle Res. Cell Motil.* *18*, 149–159.

Gregorevic, P., Blankinship, M.J., Allen, J.M., Crawford, R.W., Meuse, L., Miller, D.G., Russell, D.W., and Chamberlain, J.S. (2004). Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat. Med.* *10*, 828–834.

Griggs, R.C., Moxley, R.T., Mendell, J.R., Fenichel, G.M., Brooke, M.H., Pestronk, A., Miller, J.P., Cwik, V.A., Pandya, S., and Robison, J. (1993). Duchenne dystrophy: randomized, controlled trial of prednisone (18 months) and azathioprine (12 months). *Neurology* *43*, 520–527.

Guevel, L., Lavoie, J.R., Perez-Iratxeta, C., Rouger, K., Dubreil, L., Feron, M., Talon, S., Brand, M., and Megeney, L. a (2011). Quantitative proteomic analysis of dystrophic dog muscle. *J. Proteome Res.* *10*, 2465–2478.

Guo, C., Willem, M., Werner, A., Raivich, G., Emerson, M., Neyses, L., and Mayer, U. (2006). Absence of alpha 7 integrin in dystrophin-deficient mice causes a myopathy similar to Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 989–998.

Gussoni, E., Pavlath, G.K., Lanctot, A.M., Sharma, K.R., Miller, R.G., Steinman, L., and Blau, H.M. (1992). Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature* *356*, 435–438.

Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C.D., Buzney, E.A., Khan, M.K., Flint, A.F., Kunkel, L.M., and Mulligan, R.C. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* *401*, 390–394.

Gustafsson, M. V, Zheng, X., Pereira, T., Gradin, K., Jin, S., Lundkvist, J., Ruas, J.L., Poellinger, L., Lendahl, U., and Bondesson, M. (2005). Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev. Cell* *9*, 617–628.

Han, J., Mistriotis, P., Lei, P., Wang, D., Liu, S., and Andreadis, S.T. (2012). Nanog reverses the effects of organismal aging on mesenchymal stem cell proliferation and myogenic differentiation potential. *Stem Cells* *30*, 2746–2759.

Haslett, J., Sanoudou, D., Kho, A., Han, M., Bennett, R., Kohane, I., Beggs, A., and Kunkel, L. (2003). Gene expression profiling of Duchenne muscular dystrophy skeletal muscle. *Neurogenetics* *4*, 163–171.

Haslett, J.N., Sanoudou, D., Kho, A.T., Bennett, R.R., Greenberg, S. a, Kohane, I.S., Beggs, A.H., and Kunkel, L.M. (2002). Gene expression comparison of biopsies from Duchenne muscular dystrophy (DMD) and normal skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 15000–15005.

Hathout, Y., Marathi, R.L., Rayavarapu, S., Zhang, A., Brown, K.J., Seol, H., Gordish-Dressman, H., Cirak, S., Bello, L., Nagaraju, K., et al. (2014). Discovery of serum protein biomarkers in the mdx mouse model and cross-species comparison to Duchenne muscular dystrophy patients. *Hum. Mol. Genet.*

He, T., Peterson, T.E., Holmuhamedov, E.L., Terzic, A., Caplice, N.M., Oberley, L.W., and Katusic, Z.S. (2004). Human endothelial progenitor cells tolerate oxidative stress due to intrinsically high expression of manganese superoxide dismutase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *24*, 2021–2027.

Helliwell, T.R., Man, N.T., Morris, G.E., and Davies, K.E. (1992). The dystrophin-related protein, utrophin, is expressed on the sarcolemma of regenerating human skeletal muscle fibres in dystrophies and inflammatory myopathies. *Neuromuscul. Disord.* 2, 177–184.

Hoffman, E.P., Brown, R.H., and Kunkel, L.M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919–928.

Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S., and Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393–395.

Huang, S., Guo, Y.-P., May, G., and Enver, T. (2007). Bifurcation dynamics in lineage-commitment in bipotent progenitor cells. *Dev. Biol.* 305, 695–713.

Huang, W.-H., Chen, H.-L., Huang, P.-H., Yew, T.-L., Lin, M.-W., Lin, S.-J., and Hung, S.-C. (2014). Hypoxic mesenchymal stem cells engraft and ameliorate limb ischaemia in allogeneic recipients. *Cardiovasc. Res.* 101, 266–276.

Huard, J., Roy, R., Bouchard, J.P., Malouin, F., Richards, C.L., and Tremblay, J.P. (1992). Human myoblast transplantation between immunohistocompatible donors and recipients produces immune reactions. *Transplant. Proc.* 24, 3049–3051.

Hung, S.-P., Ho, J.H., Shih, Y.-R. V, Lo, T., and Lee, O.K. (2012). Hypoxia promotes proliferation and osteogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 30, 260–266.

Hunter, M.P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B.D., Lee, E.J., Yu, L., Xiao, T., Schafer, J., Lee, M.-L.T., Schmittgen, T.D., et al. (2008). Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 3, e3694.

Huynh, T., Uaesoontrachoon, K., Quinn, J.L., Tatem, K.S., Heier, C.R., Van Der Meulen, J.H., Yu, Q., Harris, M., Nolan, C.J., Haegeman, G., et al. (2013). Selective modulation through the glucocorticoid receptor ameliorates muscle pathology in mdx mice. *J. Pathol.* 231, 223–235.

Ichim, T.E., Alexandrescu, D.T., Solano, F., Lara, F., Campion, R.D.N., Paris, E., Woods, E.J., Murphy, M.P., Dasanu, C.A., Patel, A.N., et al. (2010). Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cell. Immunol.* 260, 75–82.

Im, W.B., Phelps, S.F., Copen, E.H., Adams, E.G., Slightom, J.L., and Chamberlain, J.S. (1996). Differential expression of dystrophin isoforms in strains of mdx mice with different mutations. *Hum. Mol. Genet.* *5*, 1149–1153.

Indumathi, S., Harikrishnan, R., Rajkumar, J.S., Sudarsanam, D., and Dhanasekaran, M. (2013). Prospective biomarkers of stem cells of human endometrium and fallopian tube compared with bone marrow. *Cell Tissue Res.*

Isaac, C., Wright, A., Usas, A., Li, H., Tang, Y., Mu, X., Greco, N., Dong, Q., Vo, N., Kang, J., et al. (2013). Dystrophin and utrophin “double knockout” dystrophic mice exhibit a spectrum of degenerative musculoskeletal abnormalities. *J. Orthop. Res.* *31*, 343–349.

Issarachai, S., Priestley, G. V, Nakamoto, B., and Papayannopoulou, T. (2002). Cells with hemopoietic potential residing in muscle are itinerant bone marrow-derived cells. *Exp. Hematol.* *30*, 366–373.

Ivanovic, Z. (2009). Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *J. Cell. Physiol.* *219*, 271–275.

Ivanovic, Z. (2013). Respect the anaerobic nature of stem cells to exploit their potential in regenerative medicine. *Regen. Med.* *8*, 677–680.

Iwańczak, F., Stawarski, A., Potyrała, M., Siedlecka-Dawidko, J., and Agrawal, G.S. (2000). Early symptoms of Duchenne muscular dystrophy--description of cases of an 18-month-old and an 8-year-old patient. *Med. Sci. Monit.* *6*, 592–595.

Jackson, K.A., Mi, T., and Goodell, M.A. (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 14482–14486.

Janssen, P.M.L., Hiranandani, N., Mays, T.A., and Rafael-Fortney, J.A. (2005). Utrophin deficiency worsens cardiac contractile dysfunction present in dystrophin-deficient mdx mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *289*, H2373–8.

Jean, E., Laoudj-Chenivesse, D., Notarnicola, C., Rouger, K., Serratrice, N., Bonnieu, A., Gay, S., Bacou, F., Duret, C., and Carnac, G. (2011). Aldehyde dehydrogenase activity promotes survival of human muscle precursor cells. *J. Cell. Mol. Med.* *15*, 119–133.

Jeanson-Leh, L., Lameth, J., Krimi, S., Buisset, J., Amor, F., Le Guiner, C., Barthélémy, I., Servais, L., Blot, S., Voit, T., et al. (2014). Serum Profiling Identifies Novel Muscle miRNA

and Cardiomyopathy-Related miRNA Biomarkers in Golden Retriever Muscular Dystrophy Dogs and Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *Am. J. Pathol.*

Jez, M., Ambady, S., Kashpur, O., Grella, A., Malcuit, C., Vilner, L., Rozman, P., and Dominko, T. (2014). Expression and differentiation between OCT4A and its Pseudogenes in human ESCs and differentiated adult somatic cells. *PLoS One* 9, e89546.

Jortay, J., Senou, M., Abou-Samra, M., Noel, L., Robert, A., Many, M.-C., and Brichard, S.M. (2012). Adiponectin and skeletal muscle: pathophysiological implications in metabolic stress. *Am. J. Pathol.* 181, 245–256.

Jouvion, G., Rouger, K., Fornasari, B., Bougras, G., Leroux, I., Segalen, J., and Cherel, Y. (2006). Functional properties of muscle-derived cells related to morphological characteristics. *Histochem. Cell Biol.* 126, 603–616.

Judge, L.M., Haraguchiln, M., and Chamberlain, J.S. (2006). Dissecting the signaling and mechanical functions of the dystrophin-glycoprotein complex. *J. Cell Sci.* 119, 1537–1546.

Kallestad, K.M., and McLoon, L.K. (2010). Defining the heterogeneity of skeletal muscle-derived side and main population cells isolated immediately ex vivo. *J. Cell. Physiol.* 222, 676–684.

Karpati, G., Ajdukovic, D., Arnold, D., Gledhill, R.B., Guttmann, R., Holland, P., Koch, P.A., Shoubridge, E., Spence, D., and Vanasse, M. (1993). Myoblast transfer in Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 34, 8–17.

Kassar-Duchossoy, L., Gayraud-Morel, B., Gomès, D., Rocancourt, D., Buckingham, M., Shinin, V., and Tajbakhsh, S. (2004). Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature* 431, 466–471.

Kayali, R., Ku, J.-M., Khitrov, G., Jung, M.E., Prikhodko, O., and Bertoni, C. (2012). Read-through compound 13 restores dystrophin expression and improves muscle function in the mdx mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 21, 4007–4020.

Kemaladewi, D.U., Hoogaars, W.M.H., van Heiningen, S.H., Terlouw, S., de Gorter, D.J.J., den Dunnen, J.T., van Ommen, G.J.B., Aartsma-Rus, A., ten Dijke, P., and 't Hoen, P.A.C. (2011). Dual exon skipping in myostatin and dystrophin for Duchenne muscular dystrophy. *BMC Med. Genomics* 4, 36.

Kim, H.K., Lee, Y.S., Sivaprasad, U., Malhotra, A., and Dutta, A. (2006). Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J. Cell Biol.* *174*, 677–687.

Kim, M.H., Kay, D.I., Rudra, R.T., Chen, B.M., Hsu, N., Izumiya, Y., Martinez, L., Spencer, M.J., Walsh, K., Grinnell, A.D., et al. (2011). Myogenic Akt signaling attenuates muscular degeneration, promotes myofiber regeneration and improves muscle function in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 1324–1338.

Kirschner, J., Schessl, J., Schara, U., Reitter, B., Stettner, G.M., Hobbiebrunken, E., Wilichowski, E., Bernert, G., Weiss, S., Stehling, F., et al. (2010). Treatment of Duchenne muscular dystrophy with ciclosporin A: a randomised, double-blind, placebo-controlled multicentre trial. *Lancet Neurol.* *9*, 1053–1059.

Kleopa, K.A., Drousiotou, A., Mavrikiou, E., Ormiston, A., and Kyriakides, T. (2006). Naturally occurring utrophin correlates with disease severity in Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 1623–1628.

Klymiuk, N., Blutke, A., Graf, A., Krause, S., Burkhardt, K., Wuensch, A., Krebs, S., Kessler, B., Zakhartchenko, V., Kurome, M., et al. (2013). Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 4368–4382.

Kobinger, G.P., Louboutin, J.-P., Barton, E.R., Sweeney, H.L., and Wilson, J.M. (2003). Correction of the dystrophic phenotype by in vivo targeting of muscle progenitor cells. *Hum. Gene Ther.* *14*, 1441–1449.

Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C., and Kunkel, L.M. (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*, 509–517.

Koenig, M., Monaco, A.P., and Kunkel, L.M. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* *53*, 219–228.

Koenig, M., Beggs, A.H., Moyer, M., Scherpf, S., Heindrich, K., Bettecken, T., Meng, G., Müller, C.R., Lindlöf, M., and Kaariainen, H. (1989). The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am. J. Hum. Genet.* *45*, 498–506.

Koo, T., Popplewell, L., Athanasopoulos, T., and Dickson, G. (2014). Triple trans-splicing adeno-associated virus vectors capable of transferring the coding sequence for full-length dystrophin protein into dystrophic mice. *Hum. Gene Ther.* 25, 98–108.

Kornegay, J.N., Tuler, S.M., Miller, D.M., and Levesque, D.C. (1988). Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs. *Muscle Nerve* 11, 1056–1064.

Kornegay, J.N., Sharp, N.J., Schueler, R.O., and Betts, C.W. (1994). Tarsal joint contracture in dogs with golden retriever muscular dystrophy. *Lab. Anim. Sci.* 44, 331–333.

Kornegay, J.N., Bogan, D.J., Bogan, J.R., Childers, M.K., Cundiff, D.D., Petroski, G.F., and Schueler, R.O. (1999). Contraction force generated by tarsal joint flexion and extension in dogs with golden retriever muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.* 166, 115–121.

Kornegay, J.N., Cundiff, D.D., Bogan, D.J., Bogan, J.R., and Okamura, C.S. (2003). The cranial sartorius muscle undergoes true hypertrophy in dogs with golden retriever muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 13, 493–500.

Kornegay, J.N., Bogan, J.R., Bogan, D.J., Childers, M.K., Li, J., Nghiem, P., Detwiler, D. a, Larsen, C.A., Grange, R.W., Bhavaraju-Sanka, R.K., et al. (2012). Canine models of Duchenne muscular dystrophy and their use in therapeutic strategies. *Mamm. Genome* 23, 85–108.

Kotelnikova, E., Shkrob, M.A., Pyatnitskiy, M.A., Ferlini, A., and Daraselia, N. (2012). Novel approach to meta-analysis of microarray datasets reveals muscle remodeling-related drug targets and biomarkers in Duchenne muscular dystrophy. *PLoS Comput. Biol.* 8, e1002365.

Kovanen, V. (2002). Intramuscular extracellular matrix: complex environment of muscle cells. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 30, 20–25.

Kuhr, C.S., Lupu, M., and Storb, R. (2007). Hematopoietic cell transplantation directly into dystrophic muscle fails to reconstitute satellite cells and myofibers. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 13, 886–888.

Lalic, T., Vossen, R.H. a M., Coffa, J., Schouten, J.P., Guc-Scekic, M., Radivojevic, D., Djuriscic, M., Breuning, M.H., White, S.J., and den Dunnen, J.T. (2005). Deletion and duplication screening in the DMD gene using MLPA. *Eur. J. Hum. Genet.* 13, 1231–1234.

Lanfossi, M., Cozzi, F., Bugini, D., Colombo, S., Scarpa, P., Morandi, L., Galbiati, S., Cornelio, F., Pozza, O., and Mora, M. (1999). Development of muscle pathology in canine X-linked muscular dystrophy. I. Delayed postnatal maturation of affected and normal muscle as revealed by myosin isoform analysis and utrophin expression. *Acta Neuropathol.* *97*, 127–138.

Larcher, T., Lafoux, A., Tesson, L., Remy, S., Thepenier, V., François, V., Le Guiner, C., Goubin, H., Dutilleul, M., Guigand, L., et al. (2014). Characterization of dystrophin deficient rats: a new model for Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* *Accepted*.

Latil, M., Rocheteau, P., Châtre, L., Sanulli, S., Mémet, S., Ricchetti, M., Tajbakhsh, S., and Chrétien, F. (2012). Skeletal muscle stem cells adopt a dormant cell state post mortem and retain regenerative capacity. *Nat. Commun.* *3*, 903.

Lavasani, M., Lu, A., Thompson, S.D., Robbins, P.D., Huard, J., and Niedernhofer, L.J. (2013). Isolation of muscle-derived stem/progenitor cells based on adhesion characteristics to collagen-coated surfaces. *Methods Mol. Biol.* *976*, 53–65.

Lee, J., Kim, H.K., Rho, J.-Y., Han, Y.-M., and Kim, J. (2006). The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *J. Biol. Chem.* *281*, 33554–33565.

Lee, J.Y., Qu-Petersen, Z., Cao, B., Kimura, S., Jankowski, R., Cummins, J., Usas, A., Gates, C., Robbins, P., Wernig, A., et al. (2000). Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J. Cell Biol.* *150*, 1085–1100.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., et al. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* *425*, 415–419.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* *23*, 4051–4060.

Lees, S.J., Childs, T.E., and Booth, F.W. (2008). p21(Cip1) expression is increased in ambient oxygen, compared to estimated physiological (5%) levels in rat muscle precursor cell culture. *Cell Prolif.* *41*, 193–207.

Lefaucheur, J.P., Pastoret, C., and Sebille, A. (1995). Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. *Anat. Rec.* *242*, 70–76.

Lessa, T.B., de Abreu, D.K., Rodrigues, M.N., Brólio, M.P., Miglino, M.A., and Ambrósio, C.E. (2014). Morphological and ultrastructural evaluation of the golden retriever muscular dystrophy trachea, lungs, and diaphragm muscle. *Microsc. Res. Tech.*

Lewis, F.C., Henning, B.J., Marazzi, G., Sassoon, D., Ellison, G.M., and Nadal-Ginard, B. (2014). Porcine skeletal muscle-derived multipotent PW1pos/Pax7neg interstitial cells: isolation, characterization, and long-term culture. *Stem Cells Transl. Med.* 3, 702–712.

Li, L., and Xie, T. (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 605–631.

Li, H., Mittal, A., Makonchuk, D.Y., Bhatnagar, S., and Kumar, A. (2009). Matrix metalloproteinase-9 inhibition ameliorates pathogenesis and improves skeletal muscle regeneration in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 18, 2584–2598.

Li, Y.-Q., Zhang, M.-F., Wen, H.-Y., Hu, C.-L., Liu, R., Wei, H.-Y., Ai, C.-M., Wang, G., Liao, X.-X., and Li, X. (2013). Comparing the diagnostic values of circulating microRNAs and cardiac troponin T in patients with acute myocardial infarction. *Clinics (Sao Paulo)*. 68, 75–80.

Liu, J.M.K., Okamura, C.S., Bogan, D.J., Bogan, J.R., Childers, M.K., and Kornegay, J.N. (2004). Effects of prednisone in canine muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 30, 767–773.

Liu, N., Williams, A.H., Kim, Y., McAnally, J., Bezprozvannaya, S., Sutherland, L.B., Richardson, J. a, Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2007a). An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 20844–20849.

Liu, N., Williams, A.H., Maxeiner, J.M., Bezprozvannaya, S., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2012a). microRNA-206 promotes skeletal muscle regeneration and delays progression of Duchenne muscular dystrophy in mice. *J. Clin. Invest.* 122, 2054–2065.

Liu, W., Wen, Y., Bi, P., Lai, X., Liu, X.S., Liu, X., and Kuang, S. (2012b). Hypoxia promotes satellite cell self-renewal and enhances the efficiency of myoblast transplantation. *Development* 139, 2857–2865.

Liu, Y.-N., Yan, X., Sun, Z., Han, Q., and Zhao, R.C.-H. (2007b). [Mice adipose derived Flk-1+ mesenchymal stem cells can ameliorate Duchenne's muscular dystrophy in Mdx mice for their multilineage potential]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 15, 306–312.

Macara, I.G., and Mili, S. (2008). Polarity and differential inheritance--universal attributes of life? *Cell* 135, 801–812.

Malerba, A., Kang, J.K., McClorey, G., Saleh, A.F., Popplewell, L., Gait, M.J., Wood, M.J., and Dickson, G. (2012). Dual Myostatin and Dystrophin Exon Skipping by Morpholino Nucleic Acid Oligomers Conjugated to a Cell-penetrating Peptide Is a Promising Therapeutic Strategy for the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 1, e62.

Malik, V., Rodino-Klapac, L.R., Viollet, L., and Mendell, J.R. (2010). Aminoglycoside-induced mutation suppression (stop codon readthrough) as a therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 3, 379–389.

Mallouk, N., Jacquemond, V., and Allard, B. (2000). Elevated subsarcolemmal Ca<sup>2+</sup> in mdx mouse skeletal muscle fibers detected with Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4950–4955.

Mann, C.J., Perdiguero, E., Kharraz, Y., Aguilar, S., Pessina, P., Serrano, A.L., and Muñoz-Cánoves, P. (2011). Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skelet. Muscle* 1, 21.

Markham, L.W., Kinnett, K., Wong, B.L., Woodrow Benson, D., and Cripe, L.H. (2008). Corticosteroid treatment retards development of ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 18, 365–370.

Mathieu, J., Zhang, Z., Nelson, A., Lamba, D. a, Reh, T. a, Ware, C., and Ruohola-Baker, H. (2013). Hypoxia induces re-entry of committed cells into pluripotency. *Stem Cells* 31, 1737–1748.

Mathieu, J., Zhou, W., Xing, Y., Sperber, H., Ferreccio, A., Agoston, Z., Kuppusamy, K.T., Moon, R.T., and Ruohola-Baker, H. (2014). Hypoxia-Inducible Factors Have Distinct and Stage-Specific Roles during Reprogramming of Human Cells to Pluripotency. *Cell Stem Cell* 1–14.

McAdam, L.C., Mayo, A.L., Alman, B.A., and Biggar, W.D. (2012). The Canadian experience with long-term deflazacort treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol.* 31, 16–20.

McCarthy, J.J., Esser, K. a, and Andrade, F.H. (2007). MicroRNA-206 is overexpressed in the diaphragm but not the hindlimb muscle of mdx mouse. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 293, C451–7.

McDonald, C.M., Abresch, R.T., Carter, G.T., Fowler, W.M., Johnson, E.R., Kilmer, D.D., and Sigford, B.J. (1995). Profiles of neuromuscular diseases. Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 74, S70–92.

McPherron, A.C., Lawler, A.M., and Lee, S.J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387, 83–90.

Mead, A.F., Petrov, M., Malik, A.S., Mitchell, M.A., Childers, M.K., Bogan, J.R., Seidner, G., Kornegay, J.N., and Stedman, H.H. (2014). Diaphragm remodeling and compensatory respiratory mechanics in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *J. Appl. Physiol.* 116, 807–815.

Megeney, L.A., Kablar, B., Garrett, K., Anderson, J.E., and Rudnicki, M.A. (1996). MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev.* 10, 1173–1183.

Megeney, L.A., Kablar, B., Perry, R.L., Ying, C., May, L., and Rudnicki, M.A. (1999). Severe cardiomyopathy in mice lacking dystrophin and MyoD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 220–225.

Meng, J., Muntoni, F., and Morgan, J.E. (2011). Stem cells to treat muscular dystrophies - where are we? *Neuromuscul. Disord.* 21, 4–12.

Meng, J., Chun, S., Asfahani, R., Lochmüller, H., Muntoni, F., and Morgan, J. (2014). Human Skeletal Muscle-derived CD133(+) Cells Form Functional Satellite Cells After Intramuscular Transplantation in Immunodeficient Host Mice. *Mol. Ther.* 22, 1008–1017.

Miller, R.G., Sharma, K.R., Pavlath, G.K., Gussoni, E., Mynhier, M., Lanctot, A.M., Greco, C.M., Steinman, L., and Blau, H.M. (1997). Myoblast implantation in Duchenne muscular dystrophy: the San Francisco study. *Muscle Nerve* 20, 469–478.

Minasi, M.G., Riminucci, M., De Angelis, L., Borello, U., Berarducci, B., Innocenzi, A., Caprioli, A., Sirabella, D., Baiocchi, M., De Maria, R., et al. (2002). The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development* 129, 2773–2783.

Mitchell, J.A., and Yochim, J.M. (1968). Intrauterine Oxygen Tension During the Estrous Cycle in the Rat: Its Relation to Uterine Respiration and Vascular Activity. *Endocrinology* 83, pp. 701–705.

Mitchell, K.J., Pannérec, A., Cadot, B., Parlakian, A., Besson, V., Gomes, E.R., Marazzi, G., and Sassoon, D. a (2010). Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nat. Cell Biol.* 12, 257–266.

Mizuno, H., Nakamura, A., Aoki, Y., Ito, N., Kishi, S., Yamamoto, K., Sekiguchi, M., Takeda, S., and Hashido, K. (2011). Identification of muscle-specific microRNAs in serum of muscular dystrophy animal models: promising novel blood-based markers for muscular dystrophy. *PLoS One* 6, e18388.

Mizuno, Y., Nonaka, I., Hirai, S., and Ozawa, E. (1993). Reciprocal expression of dystrophin and utrophin in muscles of Duchenne muscular dystrophy patients, female DMD-carriers and control subjects. *J. Neurol. Sci.* 119, 43–52.

Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T., and Quiñones-Hinojosa, A. (2010). Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 7, 150–161.

Moise, N.S., Valentine, B.A., Brown, C.A., Erb, H.N., Beck, K.A., Cooper, B.J., and Gilmour, R.F. (1991). Duchenne's cardiomyopathy in a canine model: electrocardiographic and echocardiographic studies. *J. Am. Coll. Cardiol.* 17, 812–820.

Monaco, A.P., Neve, R.L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C.J., Kurnit, D.M., and Kunkel, L.M. (1986). Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 323, 646–650.

Monaco, A.P., Bertelson, C.J., Liechti-Gallati, S., Moser, H., and Kunkel, L.M. (1988). An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 2, 90–95.

Montanaro, F., Liadaki, K., Schienda, J., Flint, A., Gussoni, E., and Kunkel, L.M. (2004). Demystifying SP cell purification: viability, yield, and phenotype are defined by isolation parameters. *Exp. Cell Res.* 298, 144–154.

Montarras, D., Morgan, J., Collins, C., Relaix, F., Zaffran, S., Cumano, A., Partridge, T., and Buckingham, M. (2005). Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science* 309, 2064–2067.

Montarras, D., L'honoré, A., and Buckingham, M. (2013). Lying low but ready for action: the quiescent muscle satellite cell. *FEBS J.* *280*, 4036–4050.

Morandi, L., Bernasconi, P., Gebbia, M., Mora, M., Crosti, F., Mantegazza, R., and Cornelio, F. (1995). Lack of mRNA and dystrophin expression in DMD patients three months after myoblast transfer. *Neuromuscul. Disord.* *5*, 291–295.

Morgan, J.E., Pagel, C.N., Sherratt, T., and Partridge, T.A. (1993). Long-term persistence and migration of myogenic cells injected into pre-irradiated muscles of mdx mice. *J. Neurol. Sci.* *115*, 191–200.

Morosetti, R., Mirabella, M., Gliubizzi, C., Broccolini, A., Sancricca, C., Pescatori, M., Gidaro, T., Tasca, G., Frusciante, R., Tonali, P.A., et al. (2007). Isolation and characterization of mesoangioblasts from facioscapulohumeral muscular dystrophy muscle biopsies. *Stem Cells* *25*, 3173–3182.

Muscari, C., Giordano, E., Bonafè, F., Govoni, M., Pasini, A., and Guarnieri, C. (2013). Priming adult stem cells by hypoxic pretreatments for applications in regenerative medicine. *J. Biomed. Sci.* *20*, 63.

Nadarajah, V.D., van Putten, M., Chaouch, A., Garrood, P., Straub, V., Lochmüller, H., Ginjaar, H.B., Aartsma-Rus, A.M., van Ommen, G.J.B., den Dunnen, J.T., et al. (2011). Serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a biomarker for monitoring disease progression in Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Neuromuscul. Disord.* *21*, 569–578.

Nakamura, A., and Takeda, S. (2011). Mammalian models of Duchenne Muscular Dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications. *J. Biomed. Biotechnol.* *2011*, 184393.

Nakatani, M., Takehara, Y., Sugino, H., Matsumoto, M., Hashimoto, O., Hasegawa, Y., Murakami, T., Uezumi, A., Takeda, S., Noji, S., et al. (2008). Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice. *FASEB J.* *22*, 477–487.

Narola, J., Pandey, S.N., Glick, A., and Chen, Y.-W. (2013). Conditional expression of TGF- $\beta$ 1 in skeletal muscles causes endomysial fibrosis and myofibers atrophy. *PLoS One* *8*, e79356.

Negrone, E., Riederer, I., Chaouch, S., Belicchi, M., Razini, P., Di Santo, J., Torrente, Y., Butler-Browne, G.S., and Mouly, V. (2009). In vivo myogenic potential of human CD133+ muscle-derived stem cells: a quantitative study. *Mol. Ther.* *17*, 1771–1778.

Neumüller, R.A., and Knoblich, J.A. (2009). Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. *Genes Dev.* *23*, 2675–2699.

Nghiem, P.P., Hoffman, E.P., Mittal, P., Brown, K.J., Schatzberg, S.J., Ghimbovski, S., Wang, Z., and Kornegay, J.N. (2013). Sparing of the dystrophin-deficient cranial sartorius muscle is associated with classical and novel hypertrophy pathways in GRMD dogs. *Am. J. Pathol.* *183*, 1411–1424.

Nicolas, N., Marazzi, G., Kelley, K., and Sassoon, D. (2005). Embryonic deregulation of muscle stress signaling pathways leads to altered postnatal stem cell behavior and a failure in postnatal muscle growth. *Dev. Biol.* *281*, 171–183.

Nitahara-Kasahara, Y., Hayashita-Kinoh, H., Ohshima-Hosoyama, S., Okada, H., Wada-Maeda, M., Nakamura, A., Okada, T., and Takeda, S. (2012). Long-term engraftment of multipotent mesenchymal stromal cells that differentiate to form myogenic cells in dogs with Duchenne muscular dystrophy. *Mol. Ther.* *20*, 168–177.

Nombela-Arrieta, C., Pivarnik, G., Winkel, B., Canty, K.J., Harley, B., Mahoney, J.E., Park, S.-Y., Lu, J., Protopopov, A., and Silberstein, L.E. (2013). Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat. Cell Biol.* *15*, 533–543.

O'Regan, a, and Berman, J.S. (2000). Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int. J. Exp. Pathol.* *81*, 373–390.

Odom, G.L., Gregorevic, P., and Chamberlain, J.S. (2007). Viral-mediated gene therapy for the muscular dystrophies: successes, limitations and recent advances. *Biochim. Biophys. Acta* *1772*, 243–262.

Okada, M., Payne, T.R., Drowley, L., Jankowski, R.J., Momoi, N., Beckman, S., Chen, W.C.W., Keller, B.B., Tobita, K., and Huard, J. (2012). Human skeletal muscle cells with a slow adhesion rate after isolation and an enhanced stress resistance improve function of ischemic hearts. *Mol. Ther.* *20*, 138–145.

Okuyama, H., Krishnamachary, B., Zhou, Y.F., Nagasawa, H., Bosch-Marce, M., and Semenza, G.L. (2006). Expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 in bone

marrow-derived mesenchymal cells is dependent on hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* *281*, 15554–15563.

Pagel, C.N., Wasgewater Wijesinghe, D.K., Taghavi Esfandouni, N., and Mackie, E.J. (2014). Osteopontin, inflammation and myogenesis: influencing regeneration, fibrosis and size of skeletal muscle. *J. Cell Commun. Signal.* *8*, 95–103.

Pallafacchina, G., François, S., Regnault, B., Czarny, B., Dive, V., Cumano, A., Montarras, D., and Buckingham, M. (2010). An adult tissue-specific stem cell in its niche: a gene profiling analysis of in vivo quiescent and activated muscle satellite cells. *Stem Cell Res.* *4*, 77–91.

Pannérec, A., Formicola, L., Besson, V., Marazzi, G., and Sassoon, D.A. (2013). Defining skeletal muscle resident progenitors and their cell fate potentials. *Development* *140*, 2879–2891.

Partridge, T.A., Grounds, M., and Sloper, J.C. (1978). Evidence of fusion between host and donor myoblasts in skeletal muscle grafts. *Nature* *273*, 306–308.

Partridge, T.A., Morgan, J.E., Coulton, G.R., Hoffman, E.P., and Kunkel, L.M. (1989). Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature* *337*, 176–179.

Paulovich, A.G., Whiteaker, J.R., Hoofnagle, A.N., and Wang, P. (2008). The interface between biomarker discovery and clinical validation: The tar pit of the protein biomarker pipeline. *Proteomics. Clin. Appl.* *2*, 1386–1402.

Péault, B., Rudnicki, M., Torrente, Y., Cossu, G., Tremblay, J.P., Partridge, T., Gussoni, E., Kunkel, L.M., and Huard, J. (2007). Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol. Ther.* *15*, 867–877.

Peng, H., and Huard, J. (2004). Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. *Transpl. Immunol.* *12*, 311–319.

Pescatori, M., Broccolini, A., Minetti, C., Bertini, E., Bruno, C., D'amico, A., Bernardini, C., Mirabella, M., Silvestri, G., Giglio, V., et al. (2007). Gene expression profiling in the early phases of DMD: a constant molecular signature characterizes DMD muscle from early postnatal life throughout disease progression. *FASEB J.* *21*, 1210–1226.

Petrof, B.J., Shrager, J.B., Stedman, H.H., Kelly, A.M., and Sweeney, H.L. (1993). Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *90*, 3710–3714.

Pichavant, C., Aartsma-Rus, A., Clemens, P.R., Davies, K.E., Dickson, G., Takeda, S., Wilton, S.D., Wolff, J. a, Wooddell, C.I., Xiao, X., et al. (2011). Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD. *Mol. Ther.* *19*, 830–840.

Van der Plas, M.C., Pilgram, G.S.K., de Jong, A.W.M., Bansraj, M.R.K.S., Fradkin, L.G., and Noordermeer, J.N. (2007). Drosophila Dystrophin is required for integrity of the musculature. *Mech. Dev.* *124*, 617–630.

Polesskaya, A., Seale, P., and Rudnicki, M.A. (2003). Wnt Signaling Induces the Myogenic Specification of Resident CD45+ Adult Stem Cells during Muscle Regeneration. *Cell* *113*, 841–852.

Porter, J.D., Khanna, S., Kaminski, H.J., Rao, J.S., Merriam, A.P., Richmonds, C.R., Leahy, P., Li, J., Guo, W., and Andrade, F.H. (2002). A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 263–272.

Price, F.D., Kuroda, K., and Rudnicki, M. a (2007). Stem cell based therapies to treat muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta* *1772*, 272–283.

Prior, T.W., and Bridgeman, S.J. (2005). Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy. *J. Mol. Diagn.* *7*, 317–326.

Prockop, D.J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* *276*, 71–74.

Qu, Z. (1998). Development of Approaches to Improve Cell Survival in Myoblast Transfer Therapy. *J. Cell Biol.* *142*, 1257–1267.

Qu, Z., Balkir, L., van Deutekom, J.C., Robbins, P.D., Pruchnic, R., and Huard, J. (1998). Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy. *J. Cell Biol.* *142*, 1257–1267.

Qu-Petersen, Z., Deasy, B., Jankowski, R., Ikezawa, M., Cummins, J., Pruchnic, R., Mytinger, J., Cao, B., Gates, C., Wernig, A., et al. (2002). Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J. Cell Biol.* *157*, 851–864.

Rando, T.A. (2001). The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 24, 1575–1594.

Rando, T.A., and Blau, H.M. (1994). Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. *J. Cell Biol.* 125, 1275–1287.

Rao, P.K., Kumar, R.M., Farkhondeh, M., Baskerville, S., and Lodish, H.F. (2006). Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8721–8726.

Ratajczak, M.Z., Majka, M., Kucia, M., Drukala, J., Pietrkowski, Z., Peiper, S., and Janowska-Wieczorek, A. (2003). Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. *Stem Cells* 21, 363–371.

Raymackers, J.M., Debaix, H., Colson-Van Schoor, M., De Backer, F., Tajeddine, N., Schwaller, B., Gailly, P., and Gillis, J.M. (2003). Consequence of parvalbumin deficiency in the mdx mouse: histological, biochemical and mechanical phenotype of a new double mutant. *Neuromuscul. Disord.* 13, 376–387.

Redshaw, Z., and Loughna, P.T. (2012). Oxygen concentration modulates the differentiation of muscle stem cells toward myogenic and adipogenic fates. *Differentiation*. 84, 193–202.

Reeves, E.K.M., Hoffman, E.P., Nagaraju, K., Damsker, J.M., and McCall, J.M. (2013). VBP15: preclinical characterization of a novel anti-inflammatory delta 9,11 steroid. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 2241–2249.

Relaix, F., Weng, X., Marazzi, G., Yang, E., Copeland, N., Jenkins, N., Spence, S.E., and Sassoon, D. (1996). Pw1, a novel zinc finger gene implicated in the myogenic and neuronal lineages. *Dev. Biol.* 177, 383–396.

Relaix, F., Demignon, J., Laclef, C., Pujol, J., Santolini, M., Niro, C., Lagha, M., Rocancourt, D., Buckingham, M., and Maire, P. (2013). Six homeoproteins directly activate Myod expression in the gene regulatory networks that control early myogenesis. *PLoS Genet.* 9, e1003425.

Richardson, R.S. (1998). Oxygen transport: air to muscle cell. *Med. Sci. Sports Exerc.* 30, 53–59.

Ricotti, V., Ridout, D.A., Scott, E., Quinlivan, R., Robb, S.A., Manzur, A.Y., and Muntoni, F. (2013). Long-term benefits and adverse effects of intermittent versus daily glucocorticoids in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 84, 698–705.

Rider, D.A., Nalathamby, T., Nurcombe, V., and Cool, S.M. (2007). Selection using the alpha-1 integrin (CD49a) enhances the multipotentiality of the mesenchymal stem cell population from heterogeneous bone marrow stromal cells. *J. Mol. Histol.* 38, 449–458.

Riekstina, U., Cakstina, I., Parfejevs, V., Hoogduijn, M., Jankovskis, G., Muiznieks, I., Muceniece, R., and Ancans, J. (2009). Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev.* 5, 378–386.

Robert, V., Massimino, M.L., Tosello, V., Marsault, R., Cantini, M., Sorrentino, V., and Pozzan, T. (2001). Alteration in calcium handling at the subcellular level in mdx myotubes. *J. Biol. Chem.* 276, 4647–4651.

Roberts, R. (1998). Dystrophins in vertebrates and invertebrates. *Hum. Mol. Genet.* 7, 589–595.

Roberts, T.C., Blomberg, K.E.M., McClorey, G., El Andaloussi, S., Godfrey, C., Betts, C., Coursindel, T., Gait, M.J., Smith, C.I.E., and Wood, M.J. a (2012). Expression analysis in multiple muscle groups and serum reveals complexity in the microRNA transcriptome of the mdx mouse with implications for therapy. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 1, e39.

Rocheffort, G.Y., Delorme, B., Lopez, A., Hérault, O., Bonnet, P., Charbord, P., Eder, V., and Domenech, J. (2006). Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells* 24, 2202–2208.

Rodesch, F., Simon, P., Donner, C., and Jauniaux, E. (1992). Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 80, 283–285.

Rodino-Klapac, L.R., Janssen, P.M.L., Shontz, K.M., Canan, B., Montgomery, C.L., Griffin, D., Heller, K., Schmelzer, L., Handy, C., Clark, K.R., et al. (2013). Micro-dystrophin and follistatin co-delivery restores muscle function in aged DMD model. *Hum. Mol. Genet.* 22, 4929–4937.

Van Rooij, E., Quiat, D., Johnson, B.A., Sutherland, L.B., Qi, X., Richardson, J.A., Kelm, R.J., and Olson, E.N. (2009). A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev. Cell* 17, 662–673.

Rosová, I., Dao, M., Capoccia, B., Link, D., and Nolte, J. a (2008). Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26, 2173–2182.

Rossi, C.A., Flaibani, M., Blaauw, B., Pozzobon, M., Figallo, E., Reggiani, C., Vitiello, L., Elvassore, N., and De Coppi, P. (2011). In vivo tissue engineering of functional skeletal muscle by freshly isolated satellite cells embedded in a photopolymerizable hydrogel. *FASEB J.* 25, 2296–2304.

Rouger, K., Brault, M., Daval, N., Leroux, I., Guigand, L., Lesoeur, J., Fernandez, B., and Cherel, Y. (2004). Muscle satellite cell heterogeneity: in vitro and in vivo evidences for populations that fuse differently. *Cell Tissue Res.* 317, 319–326.

Rouger, K., Fornasari, B., Armengol, V., Jouvion, G., Leroux, I., Dubreil, L., Feron, M., Guevel, L., and Cherel, Y. (2007). Progenitor cell isolation from muscle-derived cells based on adhesion properties. *J. Histochem. Cytochem.* 55, 607–618.

Rouger, K., Larcher, T., Dubreil, L., Deschamps, J.-Y., Le Guiner, C., Jouvion, G., Delorme, B., Lieubeau, B., Carlus, M., Fornasari, B., et al. (2011). Systemic delivery of allogenic muscle stem cells induces long-term muscle repair and clinical efficacy in duchenne muscular dystrophy dogs. *Am. J. Pathol.* 179, 2501–2518.

Rouillon, J., Zocevic, A., Leger, T., Garcia, C., Camadro, J.-M., Udd, B., Wong, B., Servais, L., Voit, T., and Svinartchouk, F. (2014). Proteomics profiling of urine reveals specific titin fragments as biomarkers of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 24, 563–573.

Roux, S., Leotot, J., Chevallier, N., Bierling, P., and Rouard, H. (2011). [Mesenchymal stromal cells: Biological properties and clinical prospects]. *Transfus. Clin. Biol.* 18, 1–12.

Ruegg, U.T. (2013). Pharmacological prospects in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Curr. Opin. Neurol.* 26, 577–584.

Le Rumeur, E., Fichou, Y., Pottier, S., Gaboriau, F., Rondeau-Mouro, C., Vincent, M., Gallay, J., and Bondon, A. (2003). Interaction of dystrophin rod domain with membrane

phospholipids. Evidence of a close proximity between tryptophan residues and lipids. *J. Biol. Chem.* 278, 5993–6001.

Le Rumeur, E., Pottier, S., Da Costa, G., Metzinger, L., Mouret, L., Rocher, C., Fourage, M., Rondeau-Mouro, C., and Bondon, A. (2007). Binding of the dystrophin second repeat to membrane di-oleyl phospholipids is dependent upon lipid packing. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 648–654.

Le Rumeur, E., Winder, S.J., and Hubert, J.-F. (2010). Dystrophin: more than just the sum of its parts. *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 1713–1722.

Sacco, A., Doyonnas, R., Kraft, P., Vitorovic, S., and Blau, H.M. (2008). Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature* 456, 502–506.

Sacco, P., Jones, D.A., Dick, J.R., and Vrbová, G. (1992). Contractile properties and susceptibility to exercise-induced damage of normal and mdx mouse tibialis anterior muscle. *Clin. Sci. (Lond.)* 82, 227–236.

Salem, H.K., and Thiemermann, C. (2010). Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells* 28, 585–596.

Sambasivan, R., Comai, G., Le Roux, I., Gomès, D., Konge, J., Dumas, G., Cimper, C., and Tajbakhsh, S. (2013). Embryonic founders of adult muscle stem cells are primed by the determination gene *Mrf4*. *Dev. Biol.* 381, 241–255.

Sampaolesi, M., Torrente, Y., Innocenzi, A., Tonlorenzi, R., D'Antona, G., Pellegrino, M.A., Barresi, R., Bresolin, N., De Angelis, M.G.C., Campbell, K.P., et al. (2003). Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science* 301, 487–492.

Sampaolesi, M., Blot, S., D'Antona, G., Granger, N., Tonlorenzi, R., Innocenzi, A., Mognol, P., Thibaud, J.-L., Galvez, B.G., Barthélémy, I., et al. (2006). Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* 444, 574–579.

Sandri, M., Coletto, L., Grumati, P., and Bonaldo, P. (2013). Misregulation of autophagy and protein degradation systems in myopathies and muscular dystrophies. *J. Cell Sci.* 126, 5325–5333.

Dos Santos, F., Andrade, P.Z., Boura, J.S., Abecasis, M.M., da Silva, C.L., and Cabral, J.M.S. (2010). Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J. Cell. Physiol.* 223, 27–35.

Sarkis, J., Vié, V., Winder, S.J., Renault, A., Le Rumeur, E., and Hubert, J.-F. (2013). Resisting sarcolemmal rupture: dystrophin repeats increase membrane-actin stiffness. *FASEB J.* 27, 359–367.

Sato, K., Li, Y., Foster, W., Fukushima, K., Badlani, N., Adachi, N., Usas, A., Fu, F.H., and Huard, J. (2003). Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. *Muscle Nerve* 28, 365–372.

Saulnier, N., Puglisi, M. a, Lattanzi, W., Castellini, L., Pani, G., Leone, G., Alfieri, S., Michetti, F., Piscaglia, A.C., and Gasbarrini, A. (2011). Gene profiling of bone marrow- and adipose tissue-derived stromal cells: a key role of Kruppel-like factor 4 in cell fate regulation. *Cytotherapy* 13, 329–340.

Schatzberg, S.J., Anderson, L. V, Wilton, S.D., Kornegay, J.N., Mann, C.J., Solomon, G.G., and Sharp, N.J. (1998). Alternative dystrophin gene transcripts in golden retriever muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 21, 991–998.

Schienda, J., Engleka, K.A., Jun, S., Hansen, M.S., Epstein, J.A., Tabin, C.J., Kunkel, L.M., and Kardon, G. (2006). Somitic origin of limb muscle satellite and side population cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 945–950.

Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7–25.

Schofield, R. (1983). The stem cell system. *Biomed. Pharmacother.* 37, 375–380.

Van Schooneveld, E., Wouters, M.C., Van der Auwera, I., Peeters, D.J., Wildiers, H., Van Dam, P.A., Vergote, I., Vermeulen, P.B., Dirix, L.Y., and Van Laere, S.J. (2012). Expression profiling of cancerous and normal breast tissues identifies microRNAs that are differentially expressed in serum from patients with (metastatic) breast cancer and healthy volunteers. *Breast Cancer Res.* 14, R34.

Schwab, K.E., and Gargett, C.E. (2007). Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Hum. Reprod.* 22, 2903–2911.

Scotton, C., Passarelli, C., Neri, M., and Ferlini, A. (2014). Biomarkers in rare neuromuscular diseases. *Exp. Cell Res.* 325, 44–49.

Shabbir, A., Zisa, D., Leiker, M., Johnston, C., Lin, H., and Lee, T. (2009). Muscular dystrophy therapy by nonautologous mesenchymal stem cells: muscle regeneration without immunosuppression and inflammation. *Transplantation* 87, 1275–1282.

Sharp, N.J., Kornegay, J.N., Van Camp, S.D., Herbstreith, M.H., Secore, S.L., Kettle, S., Hung, W.Y., Constantinou, C.D., Dykstra, M.J., and Roses, A.D. (1992). An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics* 13, 115–121.

Shcherbata, H.R., Yatsenko, A.S., Patterson, L., Sood, V.D., Nudel, U., Yaffe, D., Baker, D., and Ruohola-Baker, H. (2007). Dissecting muscle and neuronal disorders in a *Drosophila* model of muscular dystrophy. *EMBO J.* 26, 481–493.

Shi, D., Reinecke, H., Murry, C.E., and Torok-Storb, B. (2004). Myogenic fusion of human bone marrow stromal cells, but not hematopoietic cells. *Blood* 104, 290–294.

Shim, J.Y., and Kim, T.S. (2003). Relationship between utrophin and regenerating muscle fibers in duchenne muscular dystrophy. *Yonsei Med. J.* 44, 15–23.

Shimatsu, Y., Katagiri, K., Furuta, T., Nakura, M., Tanioka, Y., Yuasa, K., Tomohiro, M., Kornegay, J.N., Nonaka, I., and Takeda, S. (2003). Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ). *Exp. Anim.* 52, 93–97.

Shimatsu, Y., Yoshimura, M., Yuasa, K., Urasawa, N., Tomohiro, M., Nakura, M., Tanigawa, M., Nakamura, A., and Takeda, S. (2005). Major clinical and histopathological characteristics of canine X-linked muscular dystrophy in Japan, CXMDJ. *Acta Myol.* 24, 145–154.

Shimizu-Motohashi, Y., and Asakura, A. (2014). Angiogenesis as a novel therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy through decreased ischemia and increased satellite cells. *Front. Physiol.* 5, 50.

Shin, J.-H., Pan, X., Hakim, C.H., Yang, H.T., Yue, Y., Zhang, K., Terjung, R.L., and Duan, D. (2013). Microdystrophin ameliorates muscular dystrophy in the canine model of duchenne muscular dystrophy. *Mol. Ther.* 21, 750–757.

Simon, M.C., and Keith, B. (2008). The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 285–296.

Simonds, A.K. (2002). Respiratory complications of the muscular dystrophies. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 23, 231–238.

Sishi, B.J.N., and Engelbrecht, A.-M. (2011). Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces atrophy and apoptosis in L6 myotubes. *Cytokine* 54, 173–184.

Small, E.M., O'Rourke, J.R., Moresi, V., Sutherland, L.B., McAnally, J., Gerard, R.D., Richardson, J. a, and Olson, E.N. (2010). Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscle-enriched microRNA-486. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 4218–4223.

Stedman, H.H., Sweeney, H.L., Shrager, J.B., Maguire, H.C., Panettieri, R.A., Petrof, B., Narusawa, M., Leferovich, J.M., Sladky, J.T., and Kelly, A.M. (1991). The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 352, 536–539.

Suzuki, K., Smolenski, R.T., Jayakumar, J., Murtuza, B., Brand, N.J., and Yacoub, M.H. (2000). Heat shock treatment enhances graft cell survival in skeletal myoblast transplantation to the heart. *Circulation* 102, III216–21.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.

Tedesco, F.S., Dellavalle, A., Diaz-manera, J., Messina, G., and Cossu, G. (2010). Review series Repairing skeletal muscle : regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *120*.

Tedesco, F.S., Gerli, M.F.M., Perani, L., Benedetti, S., Ungaro, F., Cassano, M., Antonini, S., Tagliafico, E., Artusi, V., Longa, E., et al. (2012). Transplantation of genetically corrected human iPSC-derived progenitors in mice with limb-girdle muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* 4, 140ra89.

Tinsley, J.M., Blake, D.J., Roche, A., Fairbrother, U., Riss, J., Byth, B.C., Knight, A.E., Kendrick-Jones, J., Suthers, G.K., and Love, D.R. (1992). Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature* *360*, 591–593.

Tinsley, J.M., Fairclough, R.J., Storer, R., Wilkes, F.J., Potter, A.C., Squire, S.E., Powell, D.S., Cozzoli, A., Capogrosso, R.F., Lambert, A., et al. (2011). Daily treatment with SMTC1100, a novel small molecule utrophin upregulator, dramatically reduces the dystrophic symptoms in the mdx mouse. *PLoS One* *6*, e19189.

Torrente, Y., Tremblay, J.P., Pisati, F., Belicchi, M., Rossi, B., Sironi, M., Fortunato, F., El Fahime, M., D'Angelo, M.G., Caron, N.J., et al. (2001). Intraarterial injection of muscle-derived CD34(+)Sca-1(+) stem cells restores dystrophin in mdx mice. *J. Cell Biol.* *152*, 335–348.

Torrente, Y., Belicchi, M., Sampaolesi, M., Pisati, F., Meregalli, M., D'Antona, G., Tonlorenzi, R., Porretti, L., Gavina, M., Mamchaoui, K., et al. (2004). Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* *114*, 182–195.

Torrente, Y., Belicchi, M., Marchesi, C., D'Antona, G., Cogiமானian, F., Pisati, F., Gavina, M., Giordano, R., Tonlorenzi, R., Fagiolarì, G., et al. (2007). Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients. *Cell Transplant.* *16*, 563–577.

Towbin, J. a (1998). The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies. *Curr. Opin. Cell Biol.* *10*, 131–139.

Tremblay, J.P., Bouchard, J.P., Malouin, F., Théau, D., Cottrell, F., Collin, H., Rouche, A., Gilgenkrantz, S., Abbadi, N., and Tremblay, M. (1993a). Myoblast transplantation between monozygotic twin girl carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* *3*, 583–592.

Tremblay, J.P., Malouin, F., Roy, R., Huard, J., Bouchard, J.P., Satoh, A., and Richards, C.L. (1993b). Results of a triple blind clinical study of myoblast transplantations without immunosuppressive treatment in young boys with Duchenne muscular dystrophy. *Cell Transplant.* *2*, 99–112.

Tsai, C.-C., Chen, Y.-J., Yew, T.-L., Chen, L.-L., Wang, J.-Y., Chiu, C.-H., and Hung, S.-C. (2011). Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood* 117, 459–469.

Tsai, C.-C., Yew, T.-L., Yang, D.-C., Huang, W.-H., and Hung, S.-C. (2012a). Benefits of hypoxic culture on bone marrow multipotent stromal cells. *Am. J. Blood Res.* 2, 148–159.

Tsai, C.-C., Su, P.-F., Huang, Y.-F., Yew, T.-L., and Hung, S.-C. (2012b). Oct4 and Nanog directly regulate Dnmt1 to maintain self-renewal and undifferentiated state in mesenchymal stem cells. *Mol. Cell* 47, 169–182.

Tyler, K.L. (2003). Origins and early descriptions of “Duchenne muscular dystrophy”. *Muscle Nerve* 28, 402–422.

Uaesoontrachoon, K., Yoo, H.-J., Tudor, E.M., Pike, R.N., Mackie, E.J., and Pagel, C.N. (2008). Osteopontin and skeletal muscle myoblasts: association with muscle regeneration and regulation of myoblast function in vitro. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 2303–2314.

Uaesoontrachoon, K., Wasgewatte Wijesinghe, D.K., Mackie, E.J., and Pagel, C.N. (2013). Osteopontin deficiency delays inflammatory infiltration and the onset of muscle regeneration in a mouse model of muscle injury. *Dis. Model. Mech.* 6, 197–205.

Urao, N., and Ushio-Fukai, M. (2013). Redox regulation of stem/progenitor cells and bone marrow niche. *Free Radic. Biol. Med.* 54, 26–39.

Urish, K.L., Vella, J.B., Okada, M., Deasy, B.M., Tobita, K., Keller, B.B., Cao, B., Piganelli, J.D., and Huard, J. (2009). Antioxidant Levels Represent a Major Determinant in the Regenerative Capacity of Muscle Stem Cells. *20*, 509–520.

Valentine, B.A., Cooper, B.J., Cummings, J.F., and deLahunta, A. (1986). Progressive muscular dystrophy in a golden retriever dog: light microscope and ultrastructural features at 4 and 8 months. *Acta Neuropathol.* 71, 301–310.

Valentine, B.A., Cooper, B.J., de Lahunta, A., O’Quinn, R., and Blue, J.T. (1988). Canine X-linked muscular dystrophy: An animal model of Duchenne muscular dystrophy: Clinical studies. *J. Neurol. Sci.* 88, 69–81.

Valentine, B.A., Cooper, B.J., Cummings, J.F., and de Lahunta, A. (1990). Canine X-linked muscular dystrophy: morphologic lesions. *J. Neurol. Sci.* 97, 1–23.

Vallese, D., Negroni, E., Duguez, S., Ferry, A., Trollet, C., Aamiri, A., Vosshenrich, C.A.J., Füchtbauer, E.-M., Di Santo, J.P., Vitiello, L., et al. (2013). The Rag2<sup>-/-</sup>Il2rb<sup>-/-</sup>Dmd<sup>-/-</sup> mouse: a novel dystrophic and immunodeficient model to assess innovating therapeutic strategies for muscular dystrophies. *Mol. Ther.* *21*, 1950–1957.

Vandebrouck, C., Martin, D., Colson-Van Schoor, M., Debaix, H., and Gailly, P. (2002). Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. *J. Cell Biol.* *158*, 1089–1096.

Vangapandu, H., and Ai, W. (2009). Kruppel like factor 4 ( KLF4 ): a transcription factor with diverse context-dependent functions Review Article. *13*, 194–204.

Vauche, K., Marolleau, J.-P., Schmid, M., Khattar, P., Chapel, A., Catelain, C., Lecourt, S., Larghéro, J., Fiszman, M., and Vilquin, J.-T. (2009). Aldehyde dehydrogenase activity identifies a population of human skeletal muscle cells with high myogenic capacities. *Mol. Ther.* *17*, 1948–1958.

Vella, J.B., Thompson, S.D., Bucsek, M.J., Song, M., and Huard, J. (2011a). Murine and human myogenic cells identified by elevated aldehyde dehydrogenase activity: implications for muscle regeneration and repair. *PLoS One* *6*, e29226.

Vella, J.B., Thompson, S.D., Bucsek, M.J., Song, M., and Huard, J. (2011b). Murine and human myogenic cells identified by elevated aldehyde dehydrogenase activity: implications for muscle regeneration and repair. *PLoS One* *6*, e29226.

Vetrone, S.A., Montecino-Rodriguez, E., Kudryashova, E., Kramerova, I., Hoffman, E.P., Liu, S.D., Miceli, M.C., and Spencer, M.J. (2009). Osteopontin promotes fibrosis in dystrophic mouse muscle by modulating immune cell subsets and intramuscular TGF-beta. *J. Clin. Invest.* *119*, 1583–1594.

Vignier, N., Amor, F., Fogel, P., Duvallet, A., Poupiot, J., Charrier, S., Arock, M., Montus, M., Nelson, I., Richard, I., et al. (2013). Distinctive serum miRNA profile in mouse models of striated muscular pathologies. *PLoS One* *8*, e55281.

Vilquin, J.T., Brussee, V., Asselin, I., Kinoshita, I., Gingras, M., and Tremblay, J.P. (1998). Evidence of mdx mouse skeletal muscle fragility in vivo by eccentric running exercise. *Muscle Nerve* *21*, 567–576.

Vulin, A., Barthélémy, I., Goyenvalle, A., Thibaud, J.-L., Beley, C., Griffith, G., Benchaouir, R., le Hir, M., Unterfinger, Y., Lorain, S., et al. (2012). Muscle function

recovery in golden retriever muscular dystrophy after AAV1-U7 exon skipping. *Mol. Ther.* 20, 2120–2133.

Wagner, K.R., Fleckenstein, J.L., Amato, A.A., Barohn, R.J., Bushby, K., Escolar, D.M., Flanigan, K.M., Pestronk, A., Tawil, R., Wolfe, G.I., et al. (2008). A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 63, 561–571.

Wang, Y.X., and Rudnicki, M.A. (2012). Satellite cells, the engines of muscle repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 127–133.

Wei, W., He, H.-B., Zhang, W.-Y., Zhang, H.-X., Bai, J.-B., Liu, H.-Z., Cao, J.-H., Chang, K.-C., Li, X.-Y., and Zhao, S.-H. (2013). miR-29 targets Akt3 to reduce proliferation and facilitate differentiation of myoblasts in skeletal muscle development. *Cell Death Dis.* 4, e668.

Wei, Y., Li, Y., Chen, C., Stoelzel, K., Kaufmann, A.M., and Albers, A.E. (2011). Human skeletal muscle-derived stem cells retain stem cell properties after expansion in myosphere culture. *Exp. Cell Res.* 317, 1016–1027.

Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., and Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318–324.

Wicklund, M.P. (2013). The muscular dystrophies. *Continuum (Minneapolis, Minn.)* 19, 1535–1570.

Wienholds, E., and Plasterk, R.H.A. (2005). MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett.* 579, 5911–5922.

Wierenga, A.T.J., Vellenga, E., and Schuringa, J.J. (2014). Convergence of Hypoxia and TGF $\beta$  Pathways on Cell Cycle Regulation in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *PLoS One* 9, e93494.

Williams, A.H., Valdez, G., Moresi, V., Qi, X., McAnally, J., Elliott, J.L., Bassel-Duby, R., Sanes, J.R., and Olson, E.N. (2009). MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. *Science* 326, 1549–1554.

Winbanks, C.E., Beyer, C., Hagg, A., Qian, H., Sepulveda, P. V, and Gregorevic, P. (2013). miR-206 represses hypertrophy of myogenic cells but not muscle fibers via inhibition of HDAC4. *PLoS One* 8, e73589.

Wong, C.-W., Hou, P.-S., Tseng, S.-F., Chien, C.-L., Wu, K.-J., Chen, H.-F., Ho, H.-N., Kyo, S., and Teng, S.-C. (2010). Krüppel-like transcription factor 4 contributes to maintenance of telomerase activity in stem cells. *Stem Cells* 28, 1510–1517.

Wulff, K., Herrmann, F.H., Wapenaar, M.C., and Wehnert, M. (1989). Deletion screening in patients with Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurol.* 236, 470–473.

Yaden, B.C., Wang, Y.X., Wilson, J.M., Culver, A.E., Milner, A., Datta-Mannan, A., Shetler, P., Croy, J.E., Dai, G., and Krishnan, V. (2014). Inhibition of activin A ameliorates skeletal muscle injury and rescues contractile properties by inducing efficient remodeling in female mice. *Am. J. Pathol.* 184, 1152–1166.

Yang, J., Li, S.Y., Li, Y.Q., Cao, J.Q., Feng, S.W., Wang, Y.Y., Zhan, Y.X., Yu, C.S., Chen, F., Li, J., et al. (2013). MLPA-based genotype-phenotype analysis in 1053 Chinese patients with DMD/BMD. *BMC Med. Genet.* 14, 29.

Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M. a (2013). Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* 93, 23–67.

Yokota, T., Nakamura, A., Nagata, T., Saito, T., Kobayashi, M., Aoki, Y., Echigoya, Y., Partridge, T., Hoffman, E.P., and Takeda, S. (2012). Extensive and prolonged restoration of dystrophin expression with vivo-morpholino-mediated multiple exon skipping in dystrophic dogs. *Nucleic Acid Ther.* 22, 306–315.

Yoshida, Y., Takahashi, K., Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2009). Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 5, 237–241.

Yoshimoto, M., Chang, H., Shiota, M., Kobayashi, H., Umeda, K., Kawakami, A., Heike, T., and Nakahata, T. (2005). Two different roles of purified CD45<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> cells after transplantation in muscles. *Stem Cells* 23, 610–618.

Young, M.F., and Fallon, J.R. (2012). Biglycan: a promising new therapeutic for neuromuscular and musculoskeletal diseases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22, 398–400.

Yuasa, K., Hagiwara, Y., Ando, M., Nakamura, A., Takeda, S., and Hijikata, T. (2008). MicroRNA-206 is highly expressed in newly formed muscle fibers: implications regarding potential for muscle regeneration and maturation in muscular dystrophy. *Cell Struct. Funct.* 33, 163–169.

Yugeta, N., Urasawa, N., Fujii, Y., Yoshimura, M., Yuasa, K., Wada, M.R., Nakura, M., Shimatsu, Y., Tomohiro, M., Takahashi, A., et al. (2006). Cardiac involvement in Beagle-based canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ): electrocardiographic, echocardiographic, and morphologic studies. *BMC Cardiovasc. Disord.* 6, 47.

Zaharieva, I.T., Calissano, M., Scoto, M., Preston, M., Cirak, S., Feng, L., Collins, J., Kole, R., Guglieri, M., Straub, V., et al. (2013). Dystromirs as serum biomarkers for monitoring the disease severity in duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 8, e80263.

Zammit, P.S., Golding, J.P., Nagata, Y., Hudon, V., Partridge, T.A., and Beauchamp, J.R. (2004). Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J. Cell Biol.* 166, 347–357.

Zheng, B., Cao, B., Crisan, M., Sun, B., Li, G., Logar, A., Yap, S., Pollett, J.B., Drowley, L., Cassino, T., et al. (2007). Prospective identification of myogenic endothelial cells in human skeletal muscle. *Nat. Biotechnol.* 25, 1025–1034.

Zhou, Y., Fan, W., and Xiao, Y. (2014). The Effect of Hypoxia on the Stemness and Differentiation Capacity of PDLC and DPC. *Biomed Res. Int.* 2014, 890675.

Zhu, H., Sun, A., Zou, Y., and Ge, J. (2014). Inducible metabolic adaptation promotes mesenchymal stem cell therapy for ischemia: a hypoxia-induced and glycogen-based energy prestorage strategy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 870–876.



# Annexes



## Liste des publications et communications

### Publications

- Robriquet, F., Lardenois, A., Babarit, C., Larcher, T., Dubreil, L., Leroux, I., Zuber, C., Ledevin, M., Deschamps, J.-Y., Fromes, Y., Chérel, Y., Guével, L., and Rouger, K. **Differential gene expression profiling of dystrophic dog muscle after MuStem cell transplantation** (soumis dans le journal « PLoS One »)
- Robriquet, F., Babarit, C., Larcher, T., Ledevin, M., Goubin, H., Thorin, C., Rouger, K., and Guével, L. **Muscle microRNAs in Golden Retriever Muscular Dystrophy dog and their regulation after MuStem cell transplantation** (soumis dans le journal « Neuromuscular Disorders »)

### Posters

- Robriquet, F., Lorant, J., Larcher, T., Dubreil, L., Leroux, I., Zuber, C., Ledevin, M., Viau, S., Chabrand, L., Delorme, B., Chérel, Y., Guével, L., and Rouger, K. **Phenotypic characterization and myogenic potential of human MuStem cells, candidates for therapy of Duchenne Muscular Dystrophy**, SFTCG/ESGCT Congress, October 2012, Versailles, France.
- Lardenois, A., Robriquet, F., Lagarrigue, M., Guevel, B., Larcher, T., Babarit, C., Dubreil, L., Chérel, Y., Pineau, C., Guével, L., and Rouger, K. **Exploration of muscle from GRMD dogs transplanted with MuStem cells using «omics» approaches**, EuPA Congress, October 2013, St Malo, France.





# Thèse de Doctorat

Florence ROBRIQUET

**Cellules souches adultes MuStem: « Exploration de leur phénotype et leurs modalités d'action »**

**MuStem cells: « Exploration of their phenotype and their modalities of action »**

## Résumé

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie musculaire récessive liée au chromosome X qui représente la forme la plus fréquente et la plus sévère des dystrophies musculaires. Aujourd'hui, il n'existe pas de traitement curatif de cette maladie d'issue fatale. Une preuve d'efficacité thérapeutique a été établie dans l'UMR pour une population de cellules souches adultes résidentes du muscle, nommées cellules MuStem, dans le modèle gros animal de la maladie, le chien Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD). Dans la présente thèse, une étude comparée du profil d'expression génique du muscle de chiens sains, GRMD et GRMD transplantés ainsi qu'une étude de l'expression de miRNAs nous a permis d'investiguer l'impact moléculaire de la thérapie cellulaire MuStem mais également d'approfondir la physiopathologie du chien GRMD. L'administration systémique de cellules MuStem modifie l'expression de 31 gènes impliqués dans les voies de la régénération, du complexe ubiquitine-protéasome et du métabolisme. Elle permet également de corriger l'expression tissulaire des miR-1, miR-133 et miR-486. Un second volet a visé à approfondir la caractérisation de cellules MuStem désormais isolées chez l'Homme à partir de prélèvements musculaires. De manière intéressante, nous avons décrit que les cellules MuStem humaines expriment les facteurs de pluripotence Klf4, Nanog et Oct3-4. L'étude de ces cellules en conditions oxydative et hypoxique a également démontré leur capacité d'adaptation aux changements environnementaux. L'ensemble de ces résultats nous permet de mieux définir, au sens large, les cellules MuStem qui se présentent comme potentiel produit thérapeutique pour la DMD.

## Mots clés

Dystrophie musculaire de Duchenne, Chien GRMD, Thérapie cellulaire, Cellules souches adultes, Transcriptome, miRNA, Pluripotence, Micro-environnement

## Abstract

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is an X-linked recessive muscle disease that represents the most severe and common form of muscular dystrophy. No curative treatment exists to date for this fatal genetic disease. A proof of concept/efficacy has been demonstrated in the Unit for a population of muscle-resident stem cells, named MuStem cells, using the large animal model of the disease, the Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dog. In the present thesis, a comparative study of the global gene expression profile (transcriptome) of the healthy, GRMD and transplanted GRMD dog muscle as well as a miRNA study allowed us to investigate the molecular impact of MuStem cell therapy and to improve our knowledge of the GRMD dog pathophysiology. Systemic delivery of MuStem cells modifies the expression of 31 genes implicated in regeneration, ubiquitin-proteasome complex and metabolism pathways. It also restores tissue expression of miR-1, miR-133 and miR-486. A second part dealt with the characterization of MuStem cell isolated from human muscle samples. Interestingly, we describe that human MuStem cells express the pluripotency factors Klf4, Nanog and Oct3-4. The study of these cells in oxidative and hypoxic conditions also demonstrated their property of adaptability to environmental changes. All these results allow us to define better MuStem cells that are presented as a potential therapeutic product for DMD.

## Key Words

Duchenne Muscular Dystrophy, GRMD dog, Cell therapy, Adult stem cells, Transcriptome, miRNA, Pluripotency, Micro-environment