# UNIVERSITÉ DE NANTES FACULTE DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

#### **ECOLE DOCTORALE • CHIMIE BIOLOGIE**

Année 2008

Les cellules souches dérivées du muscle (MDSC) : isolement dans deux modèles gros animaux et évaluation comme candidates à la thérapie de la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD)

# THÈSE DE DOCTORAT

Discipline: Biologie, Médecine, Santé

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue publiquement par

# **Benoit FORNASARI**

le 10 juillet 2008, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs M. Marc **FISZMAN**, Directeur de recherches. Institut de Myologie. Paris M. François **CRESPEAU**, Professeur. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort Examinateurs Mme Bénédicte **CHAZAUD**, Chargée de recherches. Faculté de médecine de Créteil

M. Yann **PEREON**, *Professeur*. Faculté de médecine de Nantes *Directeurs de thèse*: M. Yan **CHEREL**, *Professeur*. École Nationale Vétérinaire de Nantes M. Karl **ROUGER**, *Chargé de recherches*. École Nationale Vétérinaire de Nantes

# Sommaire

Avant-propos	12
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Les cellules satellites musculaires	15
I.1. Origine des cellules satellites	15
I.2. Identification des cellules satellites	17
I.2.1. Localisation des cellules satellites	17
I.2.2. Morphologie des cellules satellites in vivo	18
I.2.3. Marqueurs des cellules satellites	19
I.3. Diversité des cellules dérivées du muscle	21
I.4. Contrôle moléculaire du devenir des cellules satellites	23
I.4.1. Détermination et différenciation des cellules satellites	23
I.4.2. Autorenouvellement des cellules satellites	25
I.5. Rôles des cellules satellites	28
I.5.1. Croissance musculaire	28
I.5.1.1. Hypertrophie musculaire	28
I.5.1.2. Hyperplasie musculaire	
I.5.2. Régénération musculaire	29
II. La dystrophie musculaire de Duchenne	34
II.1. Description de la dystrophie musculaire de Duchenne	35
II.1.1. Epidémiologie	35
II.1.2. Aspects cliniques	36
II.1.3. Phénotype lésionnel	38
II.2. La dystrophine	40
II.2.1. La protéine	40
II.2.2. Le complexe protéique associé à la dystrophine	41
II.2.3. Les protéines apparentées à la dystrophine	43
II.3. Les modèles animaux de la dystrophie musculaire de Duchenne	44
II.3.1. Le modèle murin : la souris « mdx » (Muscular Dystrophy X-linked)	44

II.3.2. Le modèle canin : le chien « GRMD » (Golden Retriever Muscular Dystrophy	).45
II.3.3. Le modèle félin : le chat « HFMD » (Hypertrophic feline Muscular Dystrophy)	47
II.3.4. Validité et utilisation des modèles animaux dans les essais thérapeutiques	48
II.4. Les stratégies thérapeutiques de la dystrophie musculaire de Duchenne	50
II.4.1. Traitements pharmacologiques	50
II.4.2. Thérapie génique	52
II.4.3. Thérapie cellulaire	53
III. Les approches de thérapie cellulaire des dystrophinopathies	.54
III.1. La transplantation de myoblastes	54
III.1.1. Historique	54
III.1.2. Aspects limitants de la transplantation de myoblastes	56
III.1.2.1. Mortalité des myoblastes injectés	
III.1.2.2. Dissémination des myoblastes injectés	57
III.1.2.3. Réponse immunitaire de l'hôte	58
III.1.3. Recherches actuelles sur la transplantation de myoblastes	60
III.2. Utilisation de cellules souches adultes	62
III.2.1. Définitions	62
III.2.1.1. Les différents types de cellules souches	62
III.2.1.2. Origine des cellules souches : Cellules souches embryonnaire, fœtale et adulte	64
III.2.2. Propriétés des cellules souches adultes	66
III.2.2.1. Auto-renouvellement	66
III.2.2.2. Plasticité, multipotence et transdifférenciation	68
III.2.2.3. Marqueurs phénotypiques et fonctionnels	69
III.2.3 Essais de thérapie par cellules souches adultes	72
III.2.3.1. Cellules souches d'origine musculaire	72
III.2.3.1.1. Les cellules souches dérivées du muscle (MDSC)	72
III.2.3.1.2. Les cellules de la Side Population musculaire (mSP)	76
III.2.3.2. Cellules souches non musculaires	
III.2.3.2.1. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH)	
III.2.3.2.2. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)	
III.2.3.2.3. Les cellules souches associées aux vaisseaux : mésoangioblastes et péricytes	
III.2.3.2.4. Les cellules souches circulantes : les AC133 <sup>+</sup>	91
Conclusions	.95

# **ETUDE EXPERIMENTALE**

I. Analyse de la capacité d'adhérence des MDC : Validation d'un	
paramètre biologique pour l'isolement de progéniteurs cellulaires	98
I.1. Position du problème	98
I.2. Matériel et méthodes	99
I.2.1. Animaux	99
I.2.2. Matériel musculaire	99
I.2.3. Extraction de MDC	99
I.2.4. Séparation des MDC sur la base de leur vitesse d'adhérence : Technique	
d'ensemencements successifs : « preplating »	100
I.2.5. Evaluation méthodologique de la technique de « preplating »	102
I.2.6. Evaluation de la différenciation myogénique des MDC en cultures primaires	103
I.2.7. Evaluation de la prolifération des MDC en culture clonale	104
I.2.8. Evaluation du niveau de différenciation myogénique des MDC par	
immunocytochimie	104
I.2.9. Evaluation morphométrique des MDC	105
I.2.10. Analyse statistique des résultats	105
I.3. Résumé des résultats obtenus	107
I.3.1. L'adhérence : un critère de tri des MDC	107
1.3.2. Les LAC : Une population de cellules myogéniques immatures	107
I.4 Publication	109
Il Evaluation de l'efficacité en transplantation musculaire de MDSC	dans
le modèle canin de la DMD	121
II.1. Position du problème	121
II.2. Matériel et méthodes	122
II.2.1. Animaux	122
II.2.2. Matériel musculaire	122
II.2.3. Extraction de MDC	123
II.2.4. Technique d'ensemencements successifs : « preplating »	123
II.2.5. Phénotype des LAC et des EAC	123
II 2.5.1. Immunohistochimio sur extosnins : Marquours myogániquos et endetháliaux	122

II.2.5.2. Cytométrie en flux : Marqueurs de cellules souches hématopoïétiques et de	<del>)</del>
molécules d'adhérence	125
II.2.6. Comportement in vitro des LAC et des EAC	126
II.2.6.1. Prolifération et différenciation	126
II.2.6.2. Plasticité	126
II.2.7. Greffes hétérologues de LAC et de EAC	128
II.2.7.1. Marquage des cellules par un rétrovirus recombinant	129
II.2.7.2. Immunosuppression	130
II.2.7.3. Transplantation cellulaire	130
II.2.8. Exploration des muscles dystrophiques injectés	131
II.2.8.1. Prélèvements musculaires	131
II.2.8.2. Analyse des noyaux $\beta$ -gal-positifs au sein du tissu musculaire	131
II.2.8.3. Immunohistochimie réalisées sur coupes congelées	132
II.3. Résultats	133
II.3.1. Isolement de LAC chez le chien	133
II.3.2. Phénotype des LAC	
II.3.2.1. Marqueurs myogéniques	
II.3.2.2. Marqueurs de cellules souches hématopoïétiques	
II.3.2.3. Marqueurs de cellules endothéliales et molécules d'adhérence	
II.3.3. Comportement in vitro des LAC	
II.3.3.1. Prolifération	
II.3.3.2. Différenciation	138
II.3.3.3. Plasticité	140
II.3.4. Evaluation de l'efficacité en transplantation des MDSC	142
II.3.4.1. Survie post-injection	
I.3.4.2. Fusion	
II.3.4.3. Genèse de cellules satellites	144
II.3.4.4. Restauration de la dystrophine et expression d'utrophine et de $\beta$ -dystroglyc	ane 146
III. Discussion générale	149
Annexe : Cursus parallèle	160
Thèse d'université et Résidanat en anatomie pathologique	160
Le DESV d'anatomie pathologique	160
Publications	163
Article 1 : Gene Therapy Ameliorates Cardiovascular Disease in Dogs With	
Mucopolysaccharidosis VII	163

Bi	ibliographie	187
	characteristics	170
	Article 2: Functional properties of muscle-derived cells related to morphological	

# Liste des figures

Figure 1 : Origine somitique des muscles striés squelettiques	16
Figure 2 : Localisation des cellules satellites	17
Figure 3 : Ultrastructure des cellules satellites	18
Figure 4 : Représentation schématique de la myogenèse et des marqueurs	
caractéristiques de chaque stade	20
Figure 5 : Modèle d'autorenouvellement des cellules satellites	26
Figure 6 : Mode de division et devenir des cellules satellites	27
Figure 7 : Différentes étapes de la régénérescence musculaire	31
Figure 8 : Rôles des cellules satellites dans la régénération musculaire	32
Figure 9 : Transmission de la dystrophie musculaire de Duchenne selon un mode réce	ssif
lié au chromosome X	36
Figure 10 : Structure protéique de la dystrophine	41
Figure 11 : Structure du complexe protéique associé à la dystrophine	42
Figure 12 : Principe de la thérapie cellulaire dans les dystrophinopathies	53
Figure 13 : Mécanismes majeurs expliquant la mortalité des myoblastes injectés	59
Figure 14 : Différences entre cellules souches et progéniteurs cellulaires	64
Figure 15 : Cellules souches embryonnaires et cellules souches adultes	64
Figure 16 : Obtention de cellules embryonnaires ES	65
Figure 17 : Auto-renouvellement des cellules souches	67
Figure 18 : Obtention de <i>Muscle-Derived Stem Cells</i> (MDSC) par la technique	
d'ensemencements successifs, nommée «preplating»	73
Figure 19 : Isolement des cellules de la Side Population à partir du tissu musculaire et	de
la moelle osseuse par FACS	76
Figure 20 : Différentes populations de cellules souches identifiables dans la moelle	
osseuse	79
Figure 21 : Contribution des cellules satellites et de cellules myogéniques diverses à la	ì
myogénese	96
Figure 22 : Séparation des MDC par technique d'ensemencements successifs : technique d'ensemencements	que
du « preplating »	.101
Figure 23 : Evaluation méthodologique de la technique de « preplating »	.103
Figure 24 : Protocole général d'injections intramusculaires de EAC et de LAC chez un	
chien dystrophinopathe	129

Figure 25: Immunomarquages des EAC et des MDSC sur cytospins	.135
Figure 26 : Répartition de la taille des clones obtenus à partir des EAC et des LAC	.138
Figure 27 : Evolution morphologique des EAC et des LAC	.139
Figure 28 : Potentiel de différenciation des LAC	.140
Figure 29 : Mise en évidence de la présence de noyaux $eta$ -gal-positifs au sein des musc	cles
ayant reçu des injections de EAC et de MDSC	.142
Figure 30 : Localisation des noyaux MDSC β-gal-positifs	.144
Figure 31 : Localisation en position satellite et périphérique des noyaux MDSC	.145
Figure 32 : Co-localisation de l'activité β-galactosidase nucléaire des MDSC et de	
l'expression de Pax-7	.145
Figure 33 : Expression de la dystrophine, du $\beta$ -dystroglycane et de l'utrophine dans un	
muscle de chien sain, de chien dystrophinopathe et dans un muscle ayant reçu des	
injections de MDSC	.147

# Liste des tableaux

Tableau 1 : Marqueurs des cellules satellites quiescentes et des cellules dérivées du	
muscle (MDC) en prolifération chez la souris	19
Tableau 2 : Différentes causes de dégénérescence musculaire	30
Tableau 3 : Principaux marqueurs utilisés dans la définition du phénotype des cellules	
souches adultes	70
Tableau 4 : Phénotype des MDSC (Muscle-Derived Stem Cells) isolées à partir du tissu	ı
musculaire de souris	74
Tableau 5 : Phénotype des mSP (Side Population musculaire) chez la souris et chez	
l'homme	77
Tableau 6 : Phénotypes des cellules souches hématopoïétiques (CSH) chez la souris,	
chez l'homme et chez le chien	81
Tableau 7 : Phénotypes des cellules souches mésenchymateuses (CSM) chez l'homm	ne
d'après la définition de l'ISCT ( <i>International Society for Cellular Therapy</i> )	84
Tableau 8 : Phénotype des mésoangioblastes chez la souris, chez l'homme et chez le	
chien	88
Tableau 9 : Phénotype des cellules AC133 positives chez l'homme	92
Tableau 10 : Anticorps primaires utilisés en immunohistochimie sur cytospins	124
Tableau 11 : Anticorps primaires utilisés en cytométrie en flux	125
Tableau 12 : Amorces nucléotidiques (primers) utilisés en RT-PCR	127
Tableau 13 : Proportion des <i>Adherent Cell</i> s	133
Tableau 14 : Phénotype des EAC et des LAC	134
Tableau 15 : Capacité de prolifération des EAC et des LAC en cultures clonales	137
Tableau 16 : Dénombrement et localisation des noyaux $eta$ -gal-positifs dans les muscles	
ayant reçu des injections de EAC et de MDSC	143
Tableau 17 : Dénombrement du nombre de fibres dystrophine-positives dans les musc	les
ayant reçu des injections de EAC et de MDSC	146

# Liste des abréviations

**Ac** Anticorps

**AC** Adherent Cells

**ADSC** Adipose-derived stem cells

Ag Antigène

ANOVA Analyse de la variance

**BMP** Bone Morphogenic Protein

**BSA** Bovine Serum Albumin

**CD** Cluster of Differentiation

**CFU-F** Fibroblast Colony Forming Units

**CSH** Cellule Souche Hématopoïétique

**CSM** Cellules Souche Mésenchymateuse

**DAB** acide DiAmino Benzoïque

**DAPI** 4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole

**DMEM** Dulbecco's Modified Eagles Medium

**DMD** Dystrophie Musculaire de Duchenne

**EAC** Early Adherent Cells

**ECM** Matrice Extra-Cellulaire

**EGF** Epidermal Growth Factor

**FACS** Fluorescence-Activated Cell Sorting

**FGF** Fibroblast Growth Factor

**FITC** Fluoresceine IsoThioCyanate

**Flk-1** Fetal Liver Kinase-1

**GRMD** Golden Retriever Muscle Dystrophy

**HGF/SF** Hepatocyte Growth Factor / Scatter Factor

**HMGB1** High Mobility Group Box-1

**HSPG** Protéoglycanes Heparan-Sulfatés

**ICAM-1** Inter-Cellular Adhesion Molecule-1

**IFN** Interferon

**IGF** Insulin-like Growth Factor

II Interleukine

**LAC** Late Adherent Cells

**LFA-1** Lymphocyte Function-associated Antigen-1

**LIF** Leukemia Inhibitory Factor

**Lin** Lineage

LTP Long-Term Proliferating

M199 Medium 199 HANKS

MACS Magnetic Cell Sorting

MAPC Multipotent Adult Progenitor Cells

MDC Cellule Dérivée du Muscle

MDR MultiDrug Resistance

*mdx* Dystrophie Musculaire liée au chromosome X

MHC Chaînes lourdes de la Myosine

**MP** Main Population

MNF Facteur Nucléaire des Myocytes

**MRF** Facteurs de Régulation de la Myogenèse

NCAM Neural Cell Adhesion Molecule

NK Natural KillerNO Nitric Oxide

**Pax7** Paired box gene 7

PBS Phosphate Buffered Saline

**PDGF** Platelet-Derived Growth Factor

**PECAM** Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule

**PFA** ParaFormAldéhyde

**pp** Preplating

**PSF** Pénicilline-Streptomycine -Fungizone<sup>ND</sup>

**PSGL-1** P-selectin glycoprotein ligand-1

**Rh-123** Rhodamine 123

Sca-1 Stem Cell Antigen-1

**SCID** Syndrome d'Immunodéficience Combinée Sévère

**SDF-1** Stromal-Derived Factor-1

**SP** Side Population

**SVF** Sérum de Veau Fœtal

**TGF-β** Traforming Growth Factor-β

**TNF-α** Tumor Necrosis Factor-α

**TRITC** TetramethylRhodamine-5-IsoThioCyanate

VCAM-1 Vascular Cell Adhesion Molecule-1

**VE-cadhérine** Vascular Endothélial-cadhérine

VLA-4 Very Late Antigen-4

# Avant-propos.

La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est une myopathie congénitale d'origine monogénique provoquée par une mutation du gène de la dystrophine. Les travaux en cours pour traiter cette affection comprennent des recherches pharmacologiques (thérapeutique palliative) et des recherches en thérapie génique et cellulaire (thérapeutiques curatives). Cette thèse se place dans la dernière catégorie, celle de la thérapie cellulaire.

Le muscle est un tissu hautement spécialisé formé de cellules géantes spécialisées dans la genèse du mouvement. Des cellules mononuclées, les cellules satellites, assurent croissance et régénération du tissu. Les cellules satellites ont longtemps été considérées comme formant une population cellulaire homogène. À partir des années 1980, des études ont cependant montré que la population de cellules satellites était au contraire hétérogène, avec des disparités sur le plan des propriétés biochimiques et biologiques, révélées lors des phases de croissance, mais surtout lors de la régénération du tissu musculaire.

Sur la base de leur définition, les cellules satellites ont suscité beaucoup d'intérêt pour le traitement par voie cellulaire des pathologies musculaires. Ainsi, entre les années 1980 et 1995, de nombreux travaux d'injections intramusculaires de myoblastes (cellules obtenues après mise en culture de cellules satellites), essentiellement chez la souris mdx, principal modèle de la DMD, ont été réalisés. Malheureusement, ils ont tous conduit à la démonstration d'une efficacité toute limitée de cette démarche expérimentale. À la fin des années 1990, des travaux ont démontré que les cellules satellites n'étaient pas les seules à présenter un potentiel myogénique lors de la régénération musculaire. En effet, il a été décrit à partir de 1998, au sein de différents tissus, des cellules souches adultes capables de contribuer à ce phénomène. Ces cellules sont présentes soit dans le tissu musculaire, comme les cellules souches dérivées du muscle, les cellules de la « Side Population » ou encore les cellules associées aux vaisseaux (mésoangioblastes, cellules myo-endothéliales et péricytes), soit dans d'autres tissus, comme les cellules souches de la moelle osseuse hématopoïétique, les cellules souches mésenchymateuses et les cellules souches sanguines AC133<sup>+</sup>. La découverte de ces cellules souches et plus particulièrement la définition de leur potentiel à participer à la myogenèse, a donné un nouveau souffle à la thérapie cellulaire des myopathies et permis l'émergence de nouveaux concepts pour les cellules satellites. De cette effervescence est apparue la notion d'une formidable complexité au niveau des mécanismes de régulation de la myogenèse avec notamment une idée de degré d'engagement dans la voie myogénique.

Ce manuscrit comporte une revue bibliographique suivie d'une partie expérimentale. La revue bibliographique est articulée autour de deux axes. Le premier porte sur la DMD et a pour objectif de présenter de façon synthétique les données acquises la maladie et ses modèles animaux et les stratégies thérapeutiques actuellement explorées. Le second axe présente les différents types cellulaires capables de myogenèse, avec un intérêt particulier pour leur nature, leur origine lorsqu'elle est connue, leur rôle mais aussi leur utilisation en thérapie.

Les travaux expérimentaux s'articulent en 2 temps :

- Dans un premier temps et sur un axe de recherche plutôt méthodologique, nous avons analysé les capacités d'adhérence des cellules mononucléées extraites du muscle (MDC : *Muscle Derived Cells*) par une étude approfondie de la technique de préplating.
- Dans un second temps consacré à une étude dont l'objectif est clairement appliqué, nous avons exploré le potentiel des MDC à adhérence retardée après injection intramusculaire dans le modèle canin de la DMD.

Ainsi, le travail présenté ici a eu deux objectifs majeurs :

- 1. Déterminer si le retard initial d'adhérence d'une fraction des MDC, décrit uniquement chez la souris, pouvait représenter un paramètre biologique partagé par les cellules musculaires de différentes espèces et si cette technique expérimentale pouvait permettre d'isoler des progéniteurs, ou des cellules immatures ou faiblement engagées dans le programme myogénique.
- 2. De définir le comportement *in vivo* des MDSC après leur injection intramusculaire chez le chien GRMD de façon à établir si cette fraction peut ou non représenter une candidate potentielle pour la thérapie cellulaire de la DMD.

En conclusion de ce travail, une discussion générale sur les différents résultats obtenus est présentée.

# **Etude bibliographique**

Première partie Les cellules satellites musculaires

Deuxième partie La dystrophie musculaire de Duchenne

Troisième partie Les approches de thérapie cellulaire des dystrophinopathies

# I. Les cellules satellites musculaires

Le tissu musculaire se compose de cellules hautement spécialisées dans la transformation d'énergie chimique en énergie mécanique : les fibres musculaires. Ces dernières ont perdu toute capacité de renouvellement et de réparation. Les phénomènes de croissance postnatale et de régénération de ces cellules nécessitent de fait l'intervention de cellules indifférenciées : les cellules satellites (Bischoff and Heintz, 1994).

Les cellules satellites ont été décrites pour la première fois chez la grenouille adulte au cours d'un examen au microscope électronique du muscle *tibialis anticus* (Mauro, 1961). Elles ont été identifiées plus tardivement dans le muscle d'oiseaux et de mammifères (Bischoff and Heintz, 1994; Schultz, 1976). La définition des cellules satellites est univoque lorsqu'elle repose sur des bases anatomiques. Histologiquement, le nom de « cellules satellites » définit des cellules « satellites » par rapport à la fibre musculaire, c'est-à-dire localisée en périphérie, entre la membrane plasmique et la lame basale de la myofibre. Ceci définit la niche satellite.

# I.1. Origine des cellules satellites

Les muscles striés dérivent de structures mésodermiques : les myotomes (Kieny et al., 1988). Ces formations métamériques issues de la délamination des somites, donnent la musculature axiale et du tronc ainsi que la musculature périphérique (Buckingham and Tajbakhsh, 1993; Ludolph and Konieczny, 1995). Le mésoderme branchial, ou mésoblaste des arcs branchiaux, donne les muscles de la face, de la mâchoire, du pharynx et du larynx (Cossu et al., 1996). Les cellules des somites (Fig.1), sont induites à devenir myogéniques par des signaux provenant des tissus environnants, comme la notocorde, le tube neural et l'ectoderme dorsal (Cossu et al., 1996).

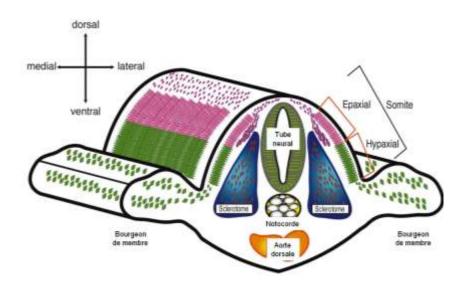


Figure 1 : Origine somitique des muscles striés squelettiques

Les cellules de la région épaxiale du somite migrent pour former les muscles du dos. Les cellules de la région hypaxiale migrent pour former les bourgeons des membres. Les structures voisines comme le tube neural, la notocorde, l'aorte dorsale et l'ectoderme sus-jacent sécrètent des signaux modulant la myogénèse (Hawke and Garry, 2001).

L'hypothèse selon laquelle les précurseurs musculaires proviennent des cellules mésodermiques multipotentes des somites a été émise dans de nombreuses études (Ordahl et al., 2000; Schultz and McCormick, 1994). Le support de cette hypothèse est principalement dérivé des expérimentations menées sur des chimères ou des greffes inter-espèces dans des modèles aviaires. Ces études ont concerné la transplantation de somites entre un donneur (embryon de caille) et un receveur (embryon de poulet) (Armand et al., 1983; Le Douarin and Barq, 1969). Les cellules de caille présentent des caractéristiques histologiques spécifiques (morphologie du nucléole des noyaux en interphase) qui permettent l'identification précise de leur localisation tissulaire (Le Douarin, 1969). Ces cellules migrent à partir des somites et contribuent à la formation des muscles des membres et à la formation des cellules satellites musculaires dans les muscles squelettiques des poulets, après leur naissance (Armand et al., 1983; Hawke and Garry, 2001).

Il est donc globalement admis que l'ensemble des myoblastes embryonnaires, fœtaux et des cellules satellites soit dérivé des somites. Cependant, chez la souris, des cultures clonales de cellules satellites sont obtenues à partir de l'aorte dorsale et non des somites. Par conséquent, une partie des cellules satellites pourrait provenir de précurseurs myogéniques vasculaires que ce soit d'une cellule primordiale d'origine endothéliale ou d'un péricyte.

#### I.2. Identification des cellules satellites

Les cellules satellites forment une population de cellules indifférenciées définies par leur position anatomique particulière le long des fibres plurinucléées.

#### I.2.1. Localisation des cellules satellites

Les cellules satellites sont les cellules mononucléées localisées au sein de la niche biologique « satellite » c'est-à-dire au contact des fibres musculaires, sous leur lame basale et contre le plasmalemme. En microscopie photonique, l'espace entre la fibre musculaire et la cellule satellite n'est pas visible et le noyau des cellules satellites est identique à celui des myofibres de sorte qu'il semble appartenir à une fibre musculaire striée (Fig.2).

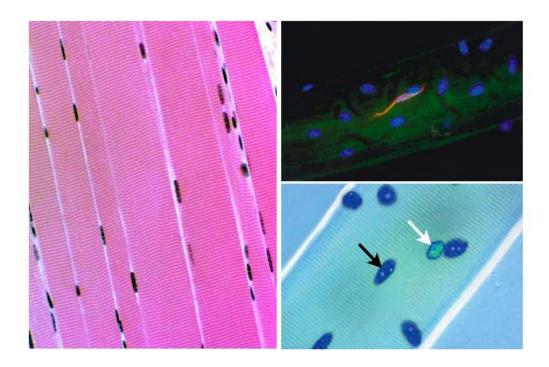


Figure 2: Localisation des cellules satellites

A. En microscopie optique, les noyaux des cellules satellites ne se distinguent pas des noyaux des myofibres. B. Cellule satellite sur une fibre isolée, identifiée grâce à un marquage M-cadhérine (rouge). La myofibre est identifiée par un marquage de la desmine (vert). Les noyaux sont contre-colorés au DAPI. C. Les noyaux des cellules satellites (flèche blanche) peuvent parfois être distingués des noyaux des myofibres (flèche noire) par leur hétérochromatine abondante, reflétant leur état de quiescence (Charge and Rudnicki, 2004; Morgan and Partridge, 2003).

## I.2.2. Morphologie des cellules satellites in vivo

Les cellules satellites sont de petites cellules mononucléées, fusiformes, pauvres en cytoplasme (Campion, 1984; Laule and Bornemann, 2001). Découvertes pour la première fois en 1961 chez la grenouille par Mauro, leur noyau est de forme ovalaire (Fig.3). Il contient une chromatine dense marginale et de volumineuses mottes de chromatine dispersées dans le nucléoplasme. Leur cytoplasme contient quelques mitochondries, quelques vésicules de pinocytose, peu de ribosomes libres, un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi très peu développés (Cross and Mercer, 1993).

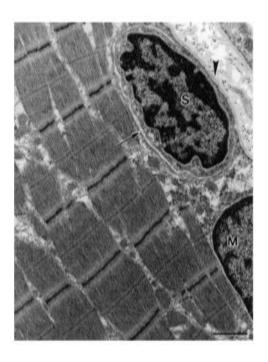


Figure 3 : Ultrastructure des cellules satellites

La cellule satellite (S) est localisée contre la membrane plasmique de la myofibre (M), sous sa lame basale (tête de flèche). L'espace intercellulaire est d'environ 20 nm (flèche). Barre : 1 µm (Roth et al., 2000).

En situation non pathologique, l'ultrastructure des cellules satellites varie suivant l'état activé ou non des cellules, l'âge et le sexe de la personne ou de l'animal à partir duquel les cellules ont été extraites, et leur appartenance à un muscle de type rapide ou de type lent. Dans un muscle adulte normal, la grande majorité des cellules satellites est quiescente, bloquée en phase Go du cycle cellulaire. La morphologie de ces cellules change lorsqu'elles sont activées. En effet, leur rapport nucléo-cytoplasmique diminue, leur cytoplasme contient plus d'organites, parfois elles peuvent présenter des prolongements cytoplasmiques et une augmentation du nombre de vésicules de pinocytose (Maier and Bornemann, 1999).

#### I.2.3. Marqueurs des cellules satellites

Les marqueurs moléculaires des cellules satellites (Tab.1) sont des protéines, exprimées spécifiquement soit à la surface des cellules (M-cadhérine, Syndécan-3, Syndécan-4, c-met), soit dans leur cytoplasme (filament intermédiaire de la desmine), soit dans leur noyau (Pax7, MyoD, Myf5). Ces outils sont utilisés pour identifier les cellules satellites *in vivo* et pour phénotyper les MDC *in vitro*.

Marqueurs moléculaires		Cellules satellites quiescentes	MDC en prolifération
Marqueurs de surface	M-cadhérine	+/-	+
	Syndécan-3	+	+
	Syndécan-4	+	+
	c-met	+	+
	Vascular Cell Adhesion Molécule-1 (VCAM1)	+	+
	Neuronal Cell Adhesion Molécule (NCAM)	+	+
	CD34	+/-	+/-
Protéines du cytosquelette	Desmine	-	+
	Vimentine	+	-
	$\alpha$ -actine lisse	-	-
Facteurs de transcription	Pax-7	+	+
	Myf-5	+/-	+
	MyoD	-	+
	Myogenic Nuclear Factor (MNF)	+	+

Tableau 1 : Marqueurs des cellules satellites quiescentes et des cellules dérivées du muscle (MDC) en prolifération chez la souris

On distingue des marqueurs de surface, des protéines du cytosquelette et des facteurs de transcription (Charge and Rudnicki, 2004).

Dans le muscle adulte, les cellules satellites quiescentes expriment principalement Pax7 (Seale et al., 2000), le syndécan-4 (Cornelison et al., 2004), la molécule d'adhésion m-cadhérine (Irintchev et al., 1994) et la sialomucine CD34 (Beauchamp et al., 2000). Pax7 est certainement le meilleur marqueur de ces cellules (Halevy et al., 2004; Seale et al., 2000; Shefer et al., 2006; Zammit et al., 2004b) alors que le CD34 n'est pas un marqueur exclusif des cellules satellites étant donné qu'il peut être exprimé par les cellules hématopoïétiques, endothéliales et certaines cellules souches. Dans les cellules satellites quiescentes, des ARNm de

Myf5 sont observés sans pour autant que la protéine soit clairement exprimée (Beauchamp et al., 2000; Shefer et al., 2006; Tajbakhsh et al., 1997; Zammit et al., 2004a). D'autres molécules peuvent être utilisées pour définir des cellules satellites quiescentes comme la lysenine (Nagata et al., 2006) et la cavéoline-1 (Volonte et al., 2005).

Après activation des cellules satellites (Fig.4), l'expression de MyoD augmente (Fuchtbauer and Westphal, 1992; Grounds et al., 1992; Yablonka-Reuveni and Rivera, 1994) en parallèle de Pax7, m-cadhérine et Myf5. Alors que les cellules satellites quiescentes expriment un CD34 tronqué, auquel il manque un domaine intracellulaire, l'activation se caractérise par une expression transitoire d'une isoforme de grande taille du CD34 (Beauchamp et al., 2000). Dans les derniers stades de la différenciation, le CD34 est ensuite réprimé. Les facteurs de régulation déterminant la différenciation myogénique terminale sont exprimés tardivement (Fuchtbauer and Westphal, 1992; Grounds et al., 1992; Yablonka-Reuveni and Rivera, 1994; Yablonka-Reuveni et al., 1999; Zammit et al., 2004b).

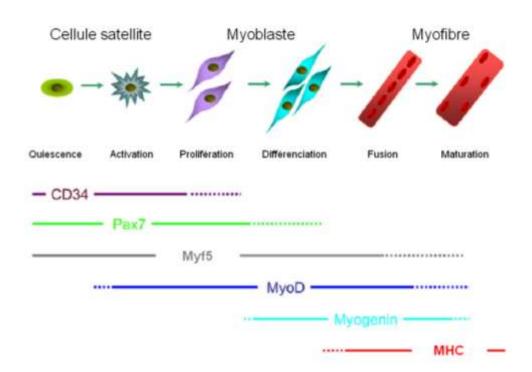


Figure 4 : Représentation schématique de la myogenèse et des marqueurs caractéristiques de chaque stade

Les cellules satellites sont quiescentes dans le muscle adulte et peuvent être activés par une lésion musculaire. Une fois activées, les cellules satellites prolifèrent et générent des myoblastes. Ces derniers entrent en différenciation et fusionnent entre eux pour former des myotubes. La maturation des myotubes aboutit à la fibre musculaire.

CD34, Pax7 and Myf5 sont exprimés dans les cellules satellites quiescentes. Leur activation est caractérisée par l'apparition de MyoD. La myogénine est exprimée plus tard suite à la différenciation des cellules. Les protéines structurales caractéristiques de la fibre musculaire striée squelettique, comme les chaines lourdes de myosine, apparaissent après maturation des myotubes (Zammit et al., 2006).

#### I.3. Diversité des cellules dérivées du muscle

Historiquement, les cellules satellites ont été décrites comme une population homogène de cellules intervenant dans la croissance et la régénération du tissu musculaire après la naissance. Cependant, les cellules satellites ont très souvent été étudiées *in vitro*, à partir de préparations de cellules dissociées extraites du tissu musculaire par digestion mécanique et enzymatique, permettant d'obtenir une suspension enrichie en cellules satellites musculaires, mais qui contient également des fibroblastes, des cellules endothéliales voire des cellules immunitaires et des cellules hématopoïétiques. L'ensemble des cellules extraites du muscle ne se résume donc pas aux cellules satellites et elles seront nommées « cellules dérivées du muscle » (MDC pour *Muscle derived cells*) dans la suite de ce travail.

Au cours des dix dernières années, de nombreuses études ont démontré le caractère très hétérogène des MDC sur la base de caractéristiques biologiques (Baroffio et al., 1996; Lagord et al., 1998; McFarland et al., 1995; Molnar et al., 1996; Rantanen et al., 1995; Watt et al., 1994; Yablonka-Reuveni et al., 1987), biochimiques (Beauchamp et al., 1999; Heslop et al., 2000) et morphologiques (Baranska et al., 1997; Schultz, 1996). Cette diversité peut être observé en fonction de la souche animale (McFarland et al., 1993b), le type de muscle considéré (McFarland et al., 1995; Pavlath et al., 1998) et se retrouve même au sein d'un muscle. Des études *in vitro*, réalisées dans différentes espèces, démontrent notamment des différences entre les sous-populations, dans les vitesses de prolifération (Lagord et al., 1998; Molnar et al., 1996; Schultz, 1996; Schultz and Lipton, 1982), les capacités de fusion (Baroffio et al., 1996) et les réponses aux facteurs de croissance (Cossu and Molinaro, 1987; McFarland et al., 1995; McFarland et al., 1993b; Watt et al., 1994).

En culture clonale, des sous-populations de MDC sont isolées en fonction de leur capacité de prolifération (Baroffio et al., 1996; Molnar et al., 1996; Rouger et al., 2004). Ainsi, les clones obtenus sont de taille (nombre de cellules par clone) variable, ce qui permet de définir au sein d'un même muscle des clones faiblement et fortement prolifératifs. Ces mêmes clones auraient une capacité de fusion différente. Les cellules des clones faiblement prolifératifs présentent une capacité de fusion supérieure aux clones très prolifératifs (Rouger et al., 2004).

La présence de cellules avec différents niveaux d'activation à l'issue de l'extraction tissulaire pourrait traduire une hétérogénéité des MDC dans leur sensibilité vis-à-vis de leur environnement.

Dans ce contexte, l'existence de sous-populations avec des sensibilités variables vis-à-vis des facteurs de croissance nécessaires à la prolifération (McFarland et al., 1995; Yablonka-Reuveni and Rivera, 1994), ou des radiations (Heslop et al., 2000) a été démontrée. HGF (Hepatocyte Growth Factor) est le premier facteur pour lequel une capacité à activer les cellules satellites quiescentes par interaction avec le récepteur c-met a été démontrée (Cornelison and Wold, 1997). Il provoque l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire (Tatsumi et al., 1998). Une hétérogénéité de réponse vis-à-vis de ce facteur a été mise en évidence pour les cellules satellites (Zeng et al., 2002).

Au sein de notre laboratoire, nous avons récemment montré que l'adaptation aux MDC de l'élutriation, technique initialement décrite dans le cadre du tri des cellules sanguines, permet de séparer les cellules de taille différente et de sélectionner 3 sous-populations représentatives (Jouvion et al., 2006): les petites cellules, au diamètre compris entre 4,5 et 5,5 μm, les cellules de taille intermédiaire, entre 6,5 et 7,5 μm, correspondant à la population majoritaire des cellules dérivées du muscle et des grandes cellules au diamètre compris entre 8,5 et 9,5 μm. L'exploration *in vitro* a permis de mettre en évidence une relation entre la taille des cellules et leur comportement *in vitro*. Les petites cellules présentent une vitesse de prolifération lente et tardive, alors que les cellules de grande taille prolifèrent intensément. Concernant les capacités de différenciation, les petites cellules se différencient lentement et expriment les chaînes lourdes de l'isoforme ventriculaire de la myosine après 4 jours de culture, alors que les cellules plus grandes l'expriment dès le premier jour de culture (Jouvion et al., 2006; cf publication en annexe).

### I.4. Contrôle moléculaire du devenir des cellules satellites

En cas d'activation, les cellules satellites expriment un ensemble de facteurs appelés facteurs myogéniques, puis dans leur étape de différenciation, expriment des protéines structurales spécifiques de la cellule musculaire. Le devenir des cellules satellites est sous le contrôle d'une série de facteurs de transcription dénommés Myogenic Regulatory Factors (MRF): Myf5, MyoD, myogénine et MRF4 (Charge and Rudnicki, 2004). Il faut également inclure en tant que MRF les facteurs de transcription à boîte homéo, Pax3 et Pax7. Pax3 et Pax7 interviendraient dans la détermination et l'autorenouvellement des cellules satellites, Myf5 et MyoD dans leur prolifération et leur détermination, MyoD et Myogénine dans leur différenciation, et enfin Myogénine et MRF4 dans la maturation des myotubes (Smith et al., 1994; Smith et al., 1993; Yablonka-Reuveni and Rivera, 1994; Zammit et al., 2004a).

#### I.4.1. Détermination et différenciation des cellules satellites

Au stade embryonnaire, les gènes Myf5, MyoD et MRF4, ainsi que Pax3 et Pax7, se situent en haut de la hiérarchie génétique qui détermine l'entrée d'une cellule dans la voie de différenciation musculaire. Myf5 et Pax3 se situent en amont de MyoD dans la hiérarchie génétique qui régule la myogenèse.

#### Pax3 et Pax7

Pax3 permet l'engagement des cellules du somite dans la détermination myogénique, ainsi que leur migration. En l'absence de Pax3 plusieurs masses musculaires font défaut, dont celles des membres. Les dérivés de la crête neurale sont également atteints. Chez le mutant Pax7<sup>-/-</sup>, les cellules satellites sont absentes et il a été proposé que Pax7 soit nécessaire pour leur spécification (Kuang et al., 2006; Oustanina et al., 2004; Relaix et al., 2006; Seale et al., 2000). Pax3, de même que Pax7, joue un rôle dans le déclenchement du programme myogénique des cellules satellites. Ces deux protéines se lient à des séquences spécifiques de l'ADN proches ou identiques, indiquant qu'elles réguleraient des gènes similaires dans la détermination myogénique (Schafer et al., 1994). Cependant, chez l'embryon, Pax3 joue un rôle dominant, dans la formation du muscle squelettique. Par l'introduction de la séquence codante de Pax7 dans un allèle de Pax3, il a été montré que Pax7 ne peut que remplir partiellement les fonctions de Pax3 (Relaix et al., 2006).

Selon des études récentes, les cellules satellites descendent de progéniteurs somitiques co-exprimant Pax3 et Pax7 (Ben-Yair and Kalcheim, 2005; Gros et al., 2005; Kassar-Duchossoy et al., 2005; Relaix et al., 2005; Schienda et al., 2006). Des cellules Pax3<sup>+</sup>/Pax7<sup>+</sup>, n'exprimant pas les marqueurs myogéniques, se divisent à l'intérieur des masses musculaires. Ces cellules sont présentes d'abord dans la région centrale du dermomyotome, structure épithéliale du somite dorsal dont dérivent les cellules musculaires, puis dans toutes les masses musculaires de l'embryon tardif et du fœtus. Les cellules qui ont exprimé Pax3 deviennent les myoblastes, avec activation des gènes de détermination myogéniques, Myf5 et MyoD, et se différencient ensuite en fibres musculaires. Chez les doubles mutants, Pax3<sup>-/-</sup>/Pax7<sup>-/-</sup>, ces cellules ne réalisent pas leur destin myogénique, mais meurent ou sont incorporées dans d'autres tissus tel l'os des côtes. En l'absence de ces cellules progénitrices, il y a un déficit majeur en muscle squelettique (Maroto et al., 1997; Tajbakhsh et al., 1997).

#### MyoD et Myf5

Plus tard dans l'embryogenèse, sont activés les facteurs de transcriptions myogéniques MyoD et Myf5. Leur activation marque l'engagement définitif dans le lignage musculaire. L'étude de knockout de ces gènes chez la souris montre que MyoD et Myf5 sont fonctionnellement redondants. Les souris mutantes MyoD-/- ou Myf-5-/- présentent un développement musculaire normal avec toutefois un retard de croissance de la musculature appendiculaire pour l'invalidation de MyoD et de la musculature tronculaire pour l'invalidation de Myf5. Une absence complète de muscle est constatée chez les souris portant la double mutation MyoD-/-/Myf5-/-. Ces résultats suggèrent que MyoD contrôlerait le développement de la musculature épaxiale tandis que Myf5 jouerait un rôle dans la musculature hypaxiale. MyoD et Myf5 sont qualifiées de gènes de détermination myogénique. Seule l'inactivation des deux en même temps empêche totalement la formation des muscles squelettiques. Ils sont nécessaires à la formation et à la survie des myoblastes (De Recondo and De Recondo, 2001).

#### Myogénine et MRF4

Les cellules satellites quiescentes n'expriment pas des niveaux détectables de MRFs. MyoD et/ou Myf5 sont les premiers exprimés dans les cellules satellites activées, alors que les transcrits codant pour la myogénine et le MRF4 ne sont observés qu'une fois la différenciation cellulaire débutée (Yablonka-Reuveni and Rivera, 1994). Cette différenciation se fait sous l'influence de la myogénine. La myogénine est activée par des facteurs de transcription, notamment Myf5. Chez l'embryon, l'expression de la myogénine est observée après celle de MyoD et de Myf5 au cours de la formation des myotomes. Les transcrits de MRF4 sont détectés en deux phases : la première coïncidant avec la

fin de l'expression de la myogénine dans les somites, la deuxième correspondant à la formation des fibres musculaires secondaires et de l'innervation de l'organe. L'inactivation du gène de la myogénine entraînerait une réduction marquée de la masse musculaire tandis que les souris MRF4-/- possèderaient une musculature normale. Ces deux facteurs seraient donc moins nécessaires dans l'établissement ou le maintien de la différenciation des cellules musculaires squelettiques.

Au cours de la myogénèse, la différenciation terminale est marquée par l'expression de la myogénine. Tous les myoblastes synthétisant la myogénine en culture sont en cours de différenciation. Ils sont aptes à la fusion et à la synthèse des protéines structurales musculaires (Yoshida et al., 1998). MRF4 est le dernier facteur à apparaître *in vitro*. La détection des ARNm codant pour MRF4 est possible juste avant le stade jeune myotube. L'expression augmente au cours de la croissance des myotubes (Nicolas et al., 1998).

#### I.4.2. Autorenouvellement des cellules satellites

Les cellules de remplacement du tissu musculaire squelettique sont les cellules satellites. Avec l'âge, la masse, la force et l'endurance musculaire diminuent chez l'homme et les modèles animaux (Karakelides and Sreekumaran Nair, 2005). Cette détérioration serait due à la diminution du nombre de cellules satellites dans le muscle (Brack et al., 2005; Gibson and Schultz, 1983) et de leur capacité proliférative (Mouly et al., 2005). Leur nombre de divisions est limité mais reste cependant suffisant pour assurer leur fonction chez un individu sain tout au long de sa vie. Par contre, il n'est pas suffisant pour répondre à des situations pathologiques ou des cycles de régénération successifs sont nécessaires (maladies génétiques dégénératives). L'homéostasie musculaire est donc fortement dépendante de la multiplication des cellules satellites.

#### Pax7 et MyoD

L'idée que les cellules satellites pouvaient s'auto-renouveler soit par division symétrique soit par division asymétrique a été proposée il y a plus de 30 ans (Moss and Leblond, 1971). Dans le cadre de la division symétrique, les cellules satellites activées se divisent, et après une période de temps variable, une ou plusieurs cellules filles retournent à un état de quiescence, alors que les autres se différencient. Il s'agit du modèle « stochastique ». Dans le modèle asymétrique, la première division après l'activation se déroule asymétriquement, c'est-à-dire que l'une des deux cellules

filles forme de nouveau une cellule satellite quiescente alors que l'autre poursuit la voie de différenciation (Collins, 2006).

In vitro, en cultures primaires ou clonales, les myoblastes qui prolifèrent co-expriment Pax7 et MyoD (Fig.5). En milieu de différenciation pauvre en sérum, pour la quasi-totalité des myoblastes, l'expression de Pax7 diminue alors que MyoD est maintenue. Ces cellules entrent en différenciation. A l'inverse, une minorité de ces cellules répriment l'expression de MyoD, maintiennent l'expression de Pax7, quittent le cycle cellulaire et deviennent quiescents (Halevy et al., 2004; Kitzmann et al., 1998; Shefer et al., 2006; Yoshida et al., 1998; Zammit et al., 2004b). MyoD contrôlerait donc le niveau de différenciation des cellules satellites. En son absence, ces cellules continuent à proliférer et présentent une différenciation myogénique retardée (Sabourin et al., 1999; Yablonka-Reuveni et al., 1999). A l'inverse, Pax7 possède un rôle crucial dans la survie et l'autorenouvellement des cellules satellites. En effet, chez les souris Pax7-/-, les cellules satellites pourtant présentes à la naissance, disparaissent rapidement lors de la période post-natale, à cause notamment de phénomènes d'apoptose (Oustanina et al., 2004; Relaix et al., 2006).

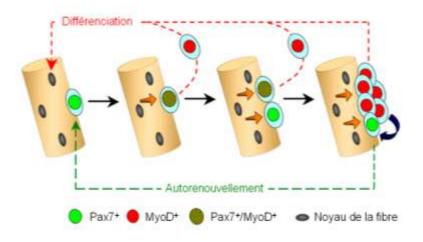


Figure 5 : Modèle d'autorenouvellement des cellules satellites

Les cellules satellites quiescentes (vert) une fois activées expriment Pax7 et MyoD (vert et rouge). En cours de différenciation, Pax7 est réprimé alors que MyoD est maintenu (rouge). Les cellules Pax7+/MyoD+ peuvent également proliférer selon des divisions asymétriques à l'origine de l'autorenouvellement des cellules satellites. (Zammit et al., 2004b)

#### Pax7 et Myf5

Récemment, Kuang et al. (2007) ont révélé que la population de cellules satellites exprimant Pax7 est constituée de cellules renouvelant le pool de cellules de réserve et de cellules orientées dans la lignée myogénique. Ces deux populations sont obtenues suite à des divisions asymétriques orientées dans l'espace des cellules satellites Pax7<sup>+</sup>/Myf5<sup>-</sup> (Conboy and Rando, 2002; Cossu and Tajbakhsh, 2007; Kuang et al., 2007; Shinin et al., 2006). La division asymétrique d'une cellule Pax7<sup>+</sup>/Myf5<sup>-</sup> génère (Fig.6):

- \_ une cellule Pax7<sup>+</sup>/Myf5<sup>+</sup>, myogénique, en contact avec la fibre musculaire (position basale);
- \_ une cellule Pax7<sup>+</sup>/Myf5<sup>-</sup>, cellule de réserve, en contact avec la membrane basale (position apicale).

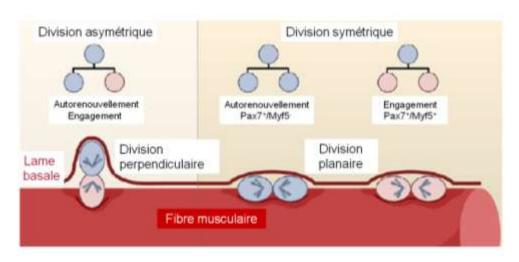


Figure 6 : Mode de division et devenir des cellules satellites

Les divisions asymétriques des cellules satellites, ou divisions apico-basales (fuseau mitotique perpendiculaire à la lame basale), génère une cellule engagée dans la lignée myogénique, Pax7+/Myf5+, en contact avec la fibre musculaire (position basale) et une cellule de réserve, Pax7+/Myf5-, en contact avec la membrane basale (position apicale). Les divisions symétriques, ou planaires (fuseau mitotique parallèle à la lame basale) permettent une augmentation du capital de cellules de réserve ou de cellules différenciées. (Cossu and Tajbakhsh, 2007; Kuang et al., 2007)

#### Notch

L'auto-renouvellement des cellules satellites peut se faire par division asymétrique des cellules. Notch et Numb, son inhibiteur, sont des déterminants du destin des cellules satellites. Notch est connu pour maintenir l'état indifférencié des cellules souches hématopoïétiques (Molofsky et al., 2004). Au cours d'une division asymétrique, Numb est distribué de façon inégale entre les deux cellules filles, ce qui induirait la sortie du cycle cellulaire pour l'une des deux (Conboy and Rando, 2002). La réduction de la capacité régénérative du muscle suite au vieillissement serait consécutive à une diminution de l'activation de Notch (Conboy et al., 2003).

D'autres marqueurs, comme le CD34 (Beauchamp et al., 2000) ou la sphingomyéline (Nagata et al., 2006), sont exprimés dans les cellules satellites quiescentes et pourraient jouer un rôle dans la régulation du maintien de cette population cellulaire (Collins, 2006).

# I.5. Rôles des cellules satellites

Les cellules satellites jouent un rôle fondamental dans les phénomènes de croissance post-natale mais également dans la régénération musculaire (Carlson and Faulkner, 1983), par leurs capacités de prolifération et de fusion entre elles et avec les fibres musculaires.

#### I.5.1. Croissance musculaire

Après la naissance, la croissance du tissu musculaire strié squelettique est due à un accroissement de la taille des fibres existantes correspondant à une hypertrophie cellulaire et éventuellement un accroissement du nombre de fibres musculaires, dénommé hyperplasie. Au cours de ces phénomènes, certaines cellules satellites sont activées, entrent en prolifération et se différencient. Elles fusionnent entre elles lors d'hyperplasie musculaire, avec des fibres matures lors d'hypertrophie musculaire.

#### I.5.1.1. Hypertrophie musculaire

Chez les Vertébrés, la formation *de novo* de fibres musculaires n'a lieu qu'avant la naissance ou très peu de temps après et le nombre de fibres musculaires est fixé à la naissance (Moss, 1968). La croissance musculaire s'effectue par l'augmentation de la taille et du diamètre des fibres musculaires grâce à l'ajout de noyaux, conservant le rapport nucléocytoplasmique. Ce phénomène, appelé hypertrophie musculaire, est rendu possible par l'incorporation des cellules satellites avec des fibres matures différenciées et fonctionnelles (Moss and Leblond, 1971).

L'hypertrophie musculaire est commune au processus de croissance musculaire normale et au phénomène accompagnant un étirement du muscle suite à un effort important et prolongé (Barnett et al., 1980; Russell et al., 1992).

## I.5.1.2. Hyperplasie musculaire

L'hyperplasie musculaire est définie comme une augmentation du nombre de fibres musculaires. Elle est due à la fusion de cellules satellites entre elles, ce qui aboutit à la formation de nouvelles fibres. Ce phénomène, peu décrit, a été observé dans des conditions physiologiques normales chez la dinde (Cherel et al., 1994), dans des conditions d'étirement musculaire (Phelan and Gonyea, 1997) ou lors d'exercice physique prolongé chez les oiseaux et les mammifères (Tamaki et al., 1997).

Après étirement musculaire, le phénomène d'hyperplasie est caractérisé *in vivo* par la formation de petites fibres (myotubes), situées dans les espaces extrafasciculaires, autour des faisceaux de fibres musculaires (Kennedy et al., 1988). Ce phénomène est observé également *in vitro*. Dans une culture de cellules satellites à confluence, les cellules fusionnent entre elles formant de petits myotubes (Chazaud et al., 1998). La taille de ces fibres en formation augmente par l'ajout de nouvelles cellules et de leur noyau. La membrane cellulaire disparaît progressivement au point de contact (Le Moigne et al., 1990). Les cellules après fusion, quittent le cycle cellulaire et commence à synthétiser des protéines musculaires, telles que des myosines (Kennedy et al., 1989).

### I.5.2. Régénération musculaire

Les causes de dégénérescence musculaire sont nombreuses (Tab.2) : déchirure mécanique de fibres dues à une surcharge d'activité physique (Appell et al., 1988; Stauber and Smith, 1998) ou à un traumatisme, défaut génétique (Childers et al., 2001; McGeachie and Grounds, 1999), administration de venins (Plant et al., 2006), brûlure thermique (Toyota and Shimada, 1984)... Elles mènent toutes à la nécrose des fibres musculaires (Lefaucheur and Sebille, 1995).

La régénération musculaire permet le remplacement des portions de fibres détruites par fusion des cellules satellites avec des fibres lésées. La régénération du muscle squelettique strié s'effectue toujours de la même façon, quelque soit le type de traumatisme (Allbrook 1981). En effet, Cette réaction stéréotypée se déroule toujours suivant les mêmes étapes (Valentine, 2007).

Causes	Différentes entités
Directes	Plaie pénétrante
	Injection intramusculaire
	Fracture osseuse
	Pression extérieure forte
Hématogènes	Pathogènes sanguins, toxines, auto-anticorps, complexes immuns
	Lymphocytes cytotoxiques (lésion à médiation immune)
	Autres cellules inflammatoires
Physiologiques	Tension excessive causant une rupture du muscle
	Lésion liée à un exercice violent
	Perte d'innervation ou de vascularisation
	Anomalies endocrinienne ou électrolytique
Génétiques	Anomalies du métabolisme
	Défauts génétiques des composants musculaires structuraux
	Anomalies de développement
Nutritionnelles/toxiques	Déficience en vitamine E/Sélénium
	Plantes toxiques
	Additifs alimentaires (ionophores)

Tableau 2 : Différentes causes de dégénérescence musculaire

On distingue des causes directes, hématogènes, physiologiques, génétiques, et nutritionnelles/toxiques. Toutes ces causes provoquent de la nécrose et de la régénérescence musculaire (Valentine, 2007).

Dans la première phase, les noyaux disparaissent des segments nécrotiques, les fibres montrent une hypercontraction segmentaire, caractérisée par un diamètre augmenté et une coloration plus marquée (Fig.7). Puis, le sarcoplasme devient hyalin, c'est-à-dire acidophile, amorphe et homogène, à cause de la perte de la structure normale des myofibrilles. Les striations ne sont plus observables. Le segment nécrotique peut se détacher des myofibres viables adjacentes. Son cytoplasme devient floculeux, granulaire, et commence à se fragmenter. Le calcium contenu dans le réticulum sarcoplasmique est relargué et une accumulation de calcium est observée dans le sarcoplasme des myofibres nécrotiques.

Dans les 24 à 48 heures, si la circulation sanguine est maintenue, des monocytes émigrent à partir des capillaires, deviennent des macrophages et envahissent la partie nécrotique de la myofibre. Ces macrophages ont un rôle essentiel. Ils sécrètent en effet des facteurs favorisant l'angiogénèse, comme le bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), ainsi que des cytokines permettant l'activation des cellules satellites. Il a récemment été montré que ces macrophages pouvaient également jouer un rôle prépondérant dans la protection et l'inhibition de l'apoptose des cellules myogéniques (Sonnet et al., 2006).

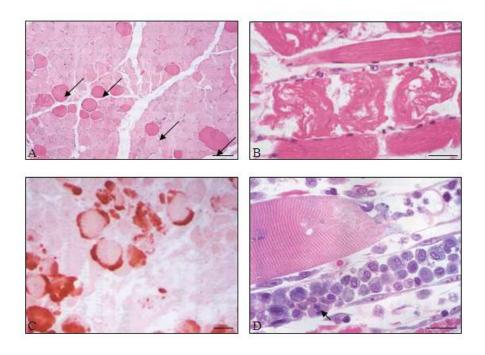


Figure 7 : Différentes étapes de la régénérescence musculaire

A. Stade initial de la nécrose ; les myofibres sont hypercontractées et présentent un cytoplasme hyalin (flèches noires). Barre :  $100~\mu m$ . B. Le cytoplasme des fibres nécrotiques peut apparaître floculeux, et se fragmenter. Barre :  $50~\mu m$ . C. Lors de la nécrose, un influx massif de calcium peut avoir lieu dans le cytoplasme des myofibres (coloration au rouge d'alizarine). Barr :  $50~\mu m$ . D. Les macrophages envahissent le tube sarcolemmal et phagocytent les débris cellulaires. Des cellules satellites sont mélangées à cette population de macrophages. On peut observer une cellule satellite activée en mitose, le long de la surface interne de la lame basale (flèche noire). Barre :  $50~\mu m$  (Valentine, 2007).

Dans le même temps, une partie des cellules satellites commencent à grossir ; vésiculeuses, les cellules présentent un nucléole proéminent, elles prolifèrent et deviennent des myoblastes (Fig.8). Les myoblastes migrent de la périphérie vers le centre du tube sarcolemmal, où se trouvent les macrophages. L'autre partie des cellules satellites est conservée, et sert à la reconstruction du pool de cellules satellites quiescentes (Collins, 2006).

Les macrophages lysent et phagocytent les débris cellulaires. Les myoblastes fusionnent entre eux pour former des myotubes, qui correspondent à des cellules musculaires fines, allongées, avec une colonne de noyaux centraux, alignés et peu espacés.

Les fibres régénérées sont caractérisées par une basophilie du cytoplasme due à une augmentation de la densité cytoplasmique en ARN, des noyaux internes alignés, une absence de striation et un diamètre inférieur à celui des fibres matures.

Lorsque la fibre mature, sous l'influence de l'innervation, son diamètre augmente, le sarcoplasme perd sa basophilie et les striations réapparaissent, signe de la formation des sarcomères.

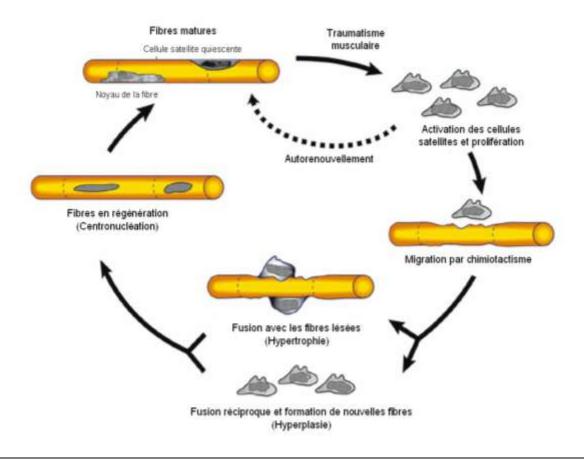


Figure 8 : Rôles des cellules satellites dans la régénération musculaire

En réponse à une lésion musculaire, Les cellules satellites activées se déplacent vers le site de la liaison, traversent les membranes basales et se disposent le long de l'axe des fibres lésées où elles commencent à fusionner. Le myotube résultant prend la place de la fibre dégénérée. Comme pour l'hyperplasie, les noyaux de leur position centrale migrent en périphérie. (Hawke and Garry, 2001)

Avec l'âge, la régénération musculaire n'est plus aussi efficace. Parallèlement à l'âge, le nombre de cellules satellites chez les rongeurs décroît ainsi que leur capacité de prolifération (Schultz and Lipton, 1982). Ce n'est pas le cas chez l'homme, où les cellules satellites des personnes âgées de 60 ans et plus présentent les mêmes capacités de prolifération que des cellules issues de jeunes de 9 ans. Cependant, malgré des capacités de prolifération normales, les cellules satellites des personnes âgées présentent un temps de latence avant prolifération qui peut aller jusqu'à 72 heures, mais surtout elles forment des myotubes plus fins et plus fragiles après fusion (Renault et al., 2000). D'autres facteurs liés à l'âge semblent jouer un rôle important. C'est le cas par exemple de l'environnement des cellules et plus particulièrement de l'innervation, de l'épaississement des membranes basales, de l'augmentation de la fibrose intra-musculaire et de la densité réduite en capillaires sanguins (Hawke and Garry, 2001).

Les cellules satellites assurent la croissance et la régénération du tissu musculaire après la naissance. De nombreuses zones d'ombre persistent quant à la compréhension fine des mécanismes moléculaires qui conduisent à la formation des myofibres.

Bien qu'il soit clairement établi que les cellules satellites musculaires sont les principales actrices dans la croissance et la régénération musculaire, il est capital de considérer également d'autres cellules présentant un potentiel myogénique, notamment dans une perspective de thérapie cellulaire de la dystrophie musculaire de Duchenne.

# II. La dystrophie musculaire de Duchenne

Le terme de myopathie recouvre toutes les maladies du muscle caractérisées par des lésions non inflammatoires et non tumorales de la fibre musculaire striée. Des remaniements inflammatoires secondaires, en général modérés, sont éventuellement présents (Dubowitz, 1985). De nombreuses myopathies humaines et animales sont identifiées, formant un vaste groupe dont l'étiologie (héréditaire ou acquise : métabolique, toxique, nutritionnelle, endocrinienne, dysimmunitaire ou ischémique), la présentation clinique, l'espèce et la race affectées sont divers. Les myopathies au sens strict recouvrent les affections dégénératives primitives de la fibre musculaire striée, excluant d'une part les anomalies du développement embryonnaire du muscle, d'autre part les lésions musculaires secondaires à des lésions du système nerveux central ou périphérique.

Le terme de dystrophie musculaire est généralement restreint aux affections musculaires dégénératives d'évolution progressive résultant d'une anomalie génétique primitive de la myofibre (Dubowitz, 1985). Les dystrophies musculaires sont caractérisées sur le plan clinique par une symptomatologie chronique progressive de faiblesse musculaire persistante, avec atrophie ou hypertrophie musculaire, anomalies de la démarche ou contractures ; sur le plan histopathologique, par l'association d'une dégénérescence et d'une nécrose initiales des fibres, d'une sclérose secondaire, et de régénération musculaire concomitante (Shelton et al., 2004).

Parmi les dystrophies musculaires humaines et animales, celles qui résultent d'un déficit partiel ou total en dystrophine, protéine du cytosquelette musculaire, sont appelées dystrophinopathies. Elles comprennent chez l'homme les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker ainsi que certaines cardiomyopathies liées au chromosome X (Feng et al., 2002).

# II.1. Description de la dystrophie musculaire de Duchenne

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie dégénérative de la fibre musculaire striée de l'enfant, d'apparition familiale ou sporadique, de transmission récessive liée au chromosome X, affectant presque uniquement les garçons et caractérisée par l'absence de dystrophine dans le muscle (Bonilla et al., 1988a; Hoffman, 1993). Cette myopathie a été décrite par Meryon en 1851 (Goebel, 2004) et par le physiologiste français G. Duchenne de Boulogne en 1868 (Duchenne, 1968). D'évolution progressive et invariablement fatale, la dystrophie musculaire de Duchenne est la plus fréquente et parmi les plus graves des myopathies héréditaires humaines.

La dystrophie musculaire de Becker (BMD) est un variant allélique plus rare et d'évolution plus lente, décrit par Becker et Kiener en 1955 (Becker and Kiener, 1955), correspondant à l'expression d'une dystrophine en quantité diminuée et/ou de taille anormale.

# II.1.1. Epidémiologie

La DMD est la plus fréquente et la plus sévère des myopathies avec une prévalence de 2 à 3 cas pour 100 000 individus (1 cas pour 3500 naissances viables de garçons) (Emery, 2002). L'incidence des femmes transmettrices est de 1 pour 2500 naissances (Recondo, 2001). L'incidence de la BMD est plus faible : 1 à 2 cas pour 30.000 naissances de garçons, avec une prévalence d'un pour cent mille individus (Gardner-Medwin, 1980). De rares filles sont atteintes de DMD (Hoffman, 1993).

La transmission des dystrophinopathies humaines est de type récessif lié au sexe (Fig.9). 70 % des cas sont dus à une transmission héréditaire par la mère du chromosome X mutant. La fréquence des femmes porteuses d'un allèle morbide DMD s'élève à 1 sur 25000 femmes dans la population, dont la plupart sont asymptomatiques. Par conséquent, l'établissement du pedigree familial ne pourra se faire qu'après naissance d'un premier enfant atteint de DMD ou d'un cas connu dans la famille. Le conseil génétique à titre prédictif est d'autant plus difficile que dans environ 30% des cas, la mutation du gène de la dystrophine n'est pas retrouvée chez les mères d'enfants malades; ces

cas de DMD sont vraisemblablement dus à des néo-mutations survenues lors de la gamétogenèse des parents (Barbujani et al., 1990).

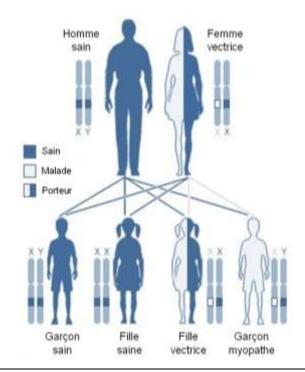


Figure 9 : Transmission de la dystrophie musculaire de Duchenne selon un mode récessif lié au chromosome X

La DMD est liée à une anomalie du gène situé sur le chromosome X codant pour une protéine musculaire, la dystrophine. Lorsque la mère est hétérozygote, elle est vectrice de l'anomalie génétique. Le risque est de 50% de transmettre l'X porteur de l'allèle morbide lors de chaque conception. Dans le cas où ce chromosome X est transmis, si l'enfant à naître est une fille, elle sera porteuse de l'anomalie comme sa mère ; si l'enfant à naître est un garçon, il sera atteint de la maladie.

# II.1.2. Aspects cliniques

La suspicion clinique de DMD est réalisée en moyenne à l'âge de quatre ans dans les cas sporadiques, suite à l'observation d'un retard ou des anomalies du développement moteur (difficultés à s'asseoir, se lever, marcher ou monter des escaliers, chutes fréquentes) (Bushby et al., 1999; Zalaudek et al., 1999). Le signe de Gower, très évocateur, est manifeste à cinq ans : il s'agit de l'utilisation systématique des membres supérieurs en appui lors du relevé à partir de la position accroupie (Pearce, 2000).

Certains groupes musculaires sont hypertrophiés précocement, notamment les muscles deltoïdes et ceux du mollet (Beenakker et al., 2002). Ces muscles subissent ensuite une infiltration par du tissu fibro-adipeux, nommée « pseudo-hypertrophie ». Au contraire, une amyotrophie et une faiblesse précoces sont perceptibles dans d'autres muscles comme les biceps, triceps, et droit du fémur (Gardner-Medwin, 1980). La faiblesse musculaire épargne les muscles oculomoteurs, faciaux et pharyngés. Dès l'âge de cinq ou six ans peut s'observer une lordose lombaire. La rétraction des tendons d'Achille accentue les déplacements sur la pointe des pieds (Recondo, 2001).

Le handicap est souvent important vers l'âge de neuf ans et demi, et toujours avant douze ans. les enfants DMD perdent alors toute capacité de locomotion et sont contraints à vivre en fauteuil roulant (Gardner-Medwin, 1980; Hoffman, 1993). L'amyotrophie devient majeure et l'immobilisation favorise les rétractions fibro-musculaires, à l'origine de malpositions articulaires (flexion des coudes, des hanches et des genoux, varus du pied), scoliose rachidienne et cyphose dorsale (Recondo, 2001).

L'atteinte simultanée des muscles squelettiques et cardiaque n'est pas rare, de 65 % des cas à 95 % des cas après 21 ans selon les auteurs (Melacini et al., 1996; Towbin and Bowles, 2000). La cardiopathie se traduit par des anomalies de l'électrocardiogramme (Melacini et al., 1996). Les signes cardiaques sont plus rarement liés à une cardiomyopathie dilatée responsable avant vingt ans d'une insuffisance cardiaque congestive fatale (Towbin, 1998; Towbin and Bowles, 2002).

Trente pour cent environ des patients DMD présentent un retard mental non évolutif. Le retard d'apprentissage du langage est commun (Iannaccone and Nanjiani, 2001). Les signes psychiatriques peuvent être légers comme une difficulté d'abstraction et de raisonnement, mais ils peuvent aller jusqu'au pseudo-autisme (Mehler, 2000; Polakoff et al., 1998).

Une insuffisance respiratoire débute après la perte de la capacité locomotrice, elle est favorisée par la position assise permanente et les déformations de la colonne vertébrale. La mort survient avant l'âge de trente ans, le plus souvent par insuffisance respiratoire aiguë (Gardner-Medwin, 1980; Hoffman, 1993).

Le dosage de la créatine kinase (CK) sérique repose sur le fait que la CK est libérée dans le sérum à la faveur d'une rupture de l'intégrité et/ou d'un trouble de la perméabilité membranaire des fibres musculaires. Le taux de CK chez les patients DMD est considérablement augmenté dès la naissance, un pic est atteint entre un et trois ans, avant l'apparition des signes cliniques. Il diminue

ensuite progressivement, mais se maintient à des valeurs supérieures aux valeurs de référence pendant plusieurs années. Vers dix ans, la cessation de l'activité locomotrice est à l'origine de la diminution du taux de créatine kinase (Hoffman, 1993; Pernice et al., 1986).

La dystrophie musculaire de Becker est caractérisée par un très grand polymorphisme clinique. L''incapacité locomotrice peut survenir tôt dans l'adolescence ou ne jamais se manifester (Hoffman, 1993). L'âge moyen d'apparition des signes cliniques est de 12 ans (Emery, 2002), les signes les plus constants sont une élévation des taux de créatine kinase sérique et une hypertrophie précoce des muscles du mollet (Emery and Skinner, 1976). L'insuffisance cardiaque congestive par cardiomyopathie dilatée constitue une cause de décès non négligeable chez les patients BMD (Park et al., 2005; Towbin and Bowles, 2000). En moyenne, l'âge du décès se situe dans la quatrième ou cinquième décennie (Emery, 2002).

# II.1.3. Phénotype lésionnel

Par définition, les lésions musculaires de la DMD sont dégénératives et d'évolution progressive. Vers l'âge de 4-5 ans, les lésions musculaires sont caractérisées par une hétérogénéité de la taille des fibres, la coexistence de lésions nécrotiques et de régénération des myofibres, ainsi qu'une fibrose endomysiale multifocale précoce (Gardner-Medwin, 1980; Hoffman, 1991)

Les fibres hyalines, arrondies, de diamètre augmenté et au cytoplasme homogène hyperacidophile, sont nombreuses. Sur une coupe transversale, la nécrose présente la particularité d'affecter simultanément plusieurs fibres adjacentes (nécrose groupée) (Hoffman, 1991). Les myofibres nécrotiques sont remplacées par des cellules inflammatoires avec prédominance de macrophages qui phagocytent les débris cellulaires et de lymphocytes T CD4+ (McDouall et al., 1990). Le nombre de fibres musculaires aux noyaux centraux dépasse trois pour cent des fibres. Les fibres musculaires présentent une taille (diamètre en coupe transversale) très hétérogène, de petites fibres en cours de régénération côtoyant de grandes fibres hypertrophiées, dont certaines sont fragmentées (Gardner-Medwin, 1980; Hoffman, 1991).

Jusqu'à l'âge de sept ans, la proportion relative des différents types de fibres dans le muscle lésionnel est conservée. Ensuite, la proportion de fibres IIB diminue considérablement (moins de 1%), et 60 à 80% des fibres sont de type I (Wang et al., 1999).

La fibrose endomysiale puis périmysiale est, avec l'infiltration du muscle par du tissu adipeux, une lésion élémentaire majeure et précoce de la DMD (avant l'âge de cinq ans). Progressivement, la régénération musculaire ne compense plus la nécrose et le nombre de fibres diminue. Vers l'âge de 10 ou 11 ans, la presque totalité du muscle a été remplacée par un tissu fibro-adipeux (Hoffman, 1991).

Les lésions épargnent les muscles oculomoteurs (Khurana et al., 1995).

Les lésions de la BMD sont moins sévères. Le nombre de fibres hypertrophiées est initialement plus important que dans la DMD. Elles coexistent avec des fibres atrophiées, disséminées dans le muscle, majoritaires en phase tardive, des fibres fragmentées et des fibres aux noyaux centraux. Les fibres hyalines sont plus rares. La fibrose et le remplacement du muscle par du tissu adipeux surviennent en phase tardive (Gardner-Medwin, 1980).

La quantité de dystrophine détectable par Western Blot est inférieure à 3 % de la quantité normale (Hoffman, 1991). Les myocytes immunopositifs (« fibres révertantes ») représentent généralement moins de 1 % des fibres et sont présents chez la moitié des patients (Wilton et al., 1997). Les fibres révertantes s'expliquent par des mutations secondes somatiques au sein de cellules satellites (Thanh et al., 1995), ou un saut d'exon(s) (Dubowitz, 1992; Wilton et al., 1997).

La réexpression sarcolemmale d'utrophine est observée dans les fibres musculaires en cours de régénération (Karpati et al., 1993), ainsi que dans les fibres musculaires matures (Karpati et al., 1993; Nguyen et al., 1995; Taylor et al., 1997).

La DMD est associée à une diminution de l'immunomarquage pour les protéines du complexe associé à la dystrophine. Les dystroglycanes (Matsumura et al., 1994; Matsumura et al., 1993), les sarcoglycanes (Draviam et al., 2001) présentent ainsi un immunomarquage membranaire de faible intensité. Les fibres révertantes expriment la dystrophine, et montrent une restauration de l'ensemble du complexe associé (Matsumura et al., 1993).

En général dans le muscle BMD, l'intensité de l'immunomarquage dystrophine est corrélée avec l'évolution clinique. Les protéines du complexe associé à la dystrophine sont présentes en quantité normale ou légèrement réduite ; la diminution d'immunopositivité sarcolemmale pour les sarcoglycanes est corrélée avec la sévérité du phénotype BMD (Rivier et al., 2000).

# II.2. La dystrophine

L'anomalie génétique à l'origine de la DMD se traduit sur le plan structural par un déficit absolu en dystrophine (Hoffman et al., 1987). Le gène de la dystrophine ou gène DMD a été identifié par clonage positionnel comme étant localisé sur le bras court du chromosome X (X p21) (Davies et al., 1983; Murray et al., 1982).

Le séquençage du gène a été commencé par Monaco et al. en 1986 (Monaco et al., 1986), et complété par Kænig et al. en 1987 (Koenig et al., 1987). C'est un des plus grands gènes connus chez l'homme ; il comprend 2,22 millions de paires de bases et 79 exons dont 22 exons répétés codant pour les domaines spectrines (Roberts et al., 1993). Le gène DMD représente à lui seul plus de 1 % de la longueur totale du chromosome X, estimée à 155 mégabases (Ahn and Kunkel, 1993; Hoffman, 1993; Muntoni et al., 2003; Ross et al., 2005; Sadoulet-Puccio and Kunkel, 1996). Il comporte 79 exons Le gigantisme du gène DMD et sa structure atypique rendent les probabilités d'altération du gène plus élevées.

### II.2.1. La protéine

La dystrophine est une protéine de 427 kilodaltons (kD) composée de 3685 acides aminés (aa), de forme allongée et articulée (Pons et al., 1990; Sadoulet-Puccio and Kunkel, 1996). Elle est normalement présente dans le muscle strié squelettique, en position sous sarcolemmale (Bonilla et al., 1988b; Zubrzycka-Gaarn et al., 1988). Elle est très peu abondante dans le tissu musculaire strié et représente environ 0,002 % du contenu protéique total (Ohlendieck and Campbell, 1991b). Son expression est plus élevée dans certaines régions spécialisées telles que les jonctions myotendineuses (Sadoulet-Puccio and Kunkel, 1996).

La dystrophine est également observée dans les fibres musculaires cardiaques, les fibres musculaires lisses du tube digestif et dans certains neurones en position post-synaptique (Boyce et al., 1991; Vannucchi et al., 2001; Vannucchi et al., 2002).

La dystrophine est composée de quatre domaines distincts (Koenig and Kunkel, 1990). Le domaine N-terminal contient trois sites susceptibles chacune de fixer l'actine du cytosquelette membranaire (Ahn and Kunkel, 1993; Blake et al., 2002; Gimona et al., 2002; Koenig et al., 1988; Norwood et al., 2000) (Fig. 10). Un domaine central souple, contenant quatre zones charnières non répétées, riches en résidus proline, conférant à la dystrophine sa flexibilité (Koenig and Kunkel, 1990). Le troisième domaine, riche en cystéine (Roberts, 2001),

permet la fixation à la calmoduline de manière calcium-dépendante (Anderson et al., 1996). Les souris déficientes en dystrophine transgéniques pour l'expression d'une dystrophine tronquée indiquent que le domaine riche en cystéine est crucial pour la fonction de la dystrophine, en raison de sa liaison directe au bêta-dystroglycane et indirecte aux sarcoglycanes (Rafael et al., 1996). Le domaine *coiled-coil*, en C-terminal, est le siège d'interactions avec d'autres protéines (Blake et al., 1998; Roberts, 2001; Sadoulet-Puccio and Kunkel, 1996).

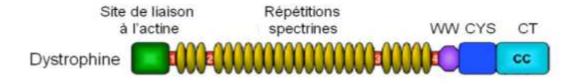


Figure 10 : Structure protéique de la dystrophine

La dystrophine est composée de quatre domaines. Un domaine N-terminal, site de liaison à l'actine (vert) ; un domaine central souple, constitué de 24 répétitions spectrines (jaune) et de 4 zones charnières (rouge) ; un domaine riche en cystéines (bleu), permettant notamment la fixation de la calmoduline ; et un domaine *coiled-coil* (bleu ciel), siège d'interactions avec d'autres protéines. Adapté de Blake et al., 2002.

# II.2.2. Le complexe protéique associé à la dystrophine

La dystrophine interagit à un complexe de protéines, le complexe DGC (*dystrophin-glycoprotein complex*, ou DAPC, *dystrophin-associated protein complex*), qui lie l'actine du cytosquelette à la laminine de la membrane basale de la myofibre. D'un poids moléculaire avoisinant 1200 kDa (Rybakova et al., 2000), le DGC comporte une dizaine de protéines différentes réparties en plusieurs sous-complexes (Fig.11). Trois sous-complexes ont été isolés lors de sa purification (Yoshida et al., 1994): le complexe des sarcoglycanes (tissus musculaires squelettique, cardiaque et lisse), le complexe des dystroglycanes (ubiquitaire) et le complexe cytoplasmique, comprenant la dystrophine, les syntrophines, l'α-dystrobrévine, et l'enzyme monoxyde d'azote synthétase neuronale (nNOS) (Blake et al., 1998; Chamberlain et al., 1997; Hoffman, 1993; Karpati, 1992).

Les rôles exacts de la dystrophine et du complexe DGC demeurent hypothétiques. Ils comprennent des rôles mécaniques ou structuraux, des rôles de transduction du signal et des rôles métaboliques.

Le DGC permettrait de maintenir l'intégrité membranaire (Petrof et al., 1993) en formant un lien physique entre les protéines structurales de la membrane basale (laminines) et les protéines structurales du cytosquelette (filaments intermédiaires et actine). Le complexe protège l'actine de la dépolymérisation et assure la stabilité de la membrane plasmique musculaire au cours de la contraction (Rybakova et al., 1996; Rybakova and Ervasti, 1997). Ses multiples interactions avec des protéines du signal (Grb2, calmoduline) indiquent un rôle dans la signalisation intracellulaire. Enfin, il pourrait être impliqué dans la régulation du niveau d'excitabilité de la fibre en régulant les canaux ioniques.

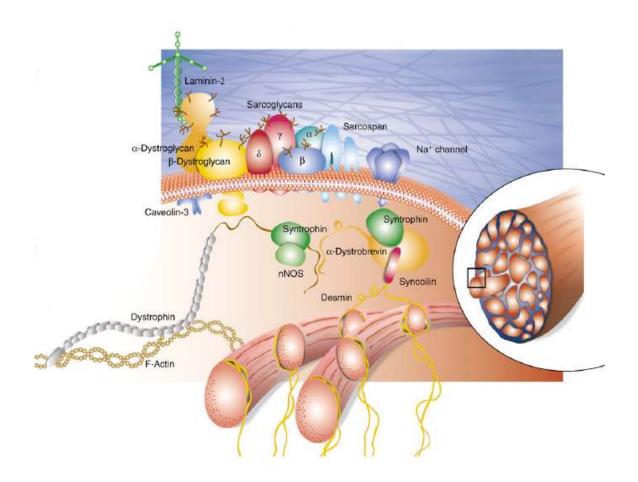


Figure 11 : Structure du complexe protéigue associé à la dystrophine

La dystrophine est liée au complexe des dystroglycanes, et par celui-ci à la laminine-2 du côté extracellulaire, et la cavéoline-3 du côté intracellulaire. Le complexe des dystroglycanes est lié directement au complexe des sarcoglycanes qui, lui, est directement lié au sarcospan.

En intracellulaire, la dystrophine est directement liée à l'actine et à la syntrophine, ainsi qu'à l'α-dystrobrévine. Par ces protéines, le complexe est lié à nNOS, à un canal sodique voltage-dépendant et à la syncoiline (Ehmsen et al., 2002).

# II.2.3. Les protéines apparentées à la dystrophine

Il existe toute une famille de protéines apparentées à la dystrophine, présentes notamment dans les tissus musculaires et nerveux. Cette famille est caractérisée par la possession d'un domaine ZZ dans la région riche en cystéine et d'un domaine CC (alpha-hélicoïdal) dans la région C-terminale (Blake et al., 1998). Elle est divisée en deux sous-familles : les utrophines (ou DRP, *dystrophin-related proteins*), et les dystrobrévines.

L'utrophine ou DRP1 est une protéine autosomique (locus 6q24) paralogue de la dystrophine (Tinsley et al., 1992) d'expression ubiquitaire (Karpati et al., 1993; Love et al., 1991; Nguyen et al., 1991; Nguyen et al., 1995), dont le gène, gène UTRN, ainsi que le transcrit ont été identifiés par Love et al. en 1989 (Love et al., 1989). L'utrophine s'associe ainsi à un complexe similaire à celui associé à la dystrophine, mais comportant des isoformes ou des quantités différentes des membres du complexe (Peters et al., 1997). L'utrophine relie l'actine du cytosquelette à la membrane basale *via* l'α-dystroglycane (Amann et al., 1999; Galkin et al., 2002; Morris et al., 1999)

L'utrophine est l'homologue embryonnaire de la dystrophine, partiellement et progressivement remplacée par celle-ci dès les stades tardifs de gestation, dans le muscle (Clerk et al., 1993; Lin and Burgunder, 2000; Lin et al., 1998) et l'encéphale (Sogos et al., 2002). Dans le muscle strié adulte, elle est colocalisée au niveau des jonctions neuromusculaires avec les récepteurs à l'acétylcholine (Vater et al., 1998).

L'expression d'utrophine s'étend à tout le sarcolemme sur les fibres musculaires en régénération (Gramolini and Jasmin, 1999; Lin et al., 1998; Shim and Kim, 2003), myoblastes et myotubes au cours de la myogenèse (Gramolini and Jasmin, 1999; Teijeira et al., 1998) et sur les fibres matures au cours des dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker (Karpati, 1992; Karpati et al., 1993; Nguyen et al., 1991; Nguyen et al., 1995; Rivier et al., 1999; Shim and Kim, 2003; Taylor et al., 1997).

L'homologie entre utrophine et dystrophine et la capacité de l'utrophine à lier un complexe similaire à celui associé à la dystrophine, suggèrent qu'elle pourrait compenser l'absence de dystrophine (Love et al., 1989; Perkins and Davies, 2002).

Alpha et bêta-dystrobrévines sont des protéines à la fois homologues et associées aux portions distales de la dystrophine (Roberts, 2001).

# II.3. Les modèles animaux de la dystrophie musculaire de Duchenne

Des dystrophinopathies similaires à celles observées chez l'homme ont été décrites dans trois espèces animales (Hoffman, 1991). Ces trois modèles animaux sont la souris *mdx* (*X-linked Muscular Dystrophy*) identifiée en 1984 (Bulfield et al., 1984), le chien GRMD (*Golden Retriever Muscular Dystrophy*) identifié en 1986 (Valentine et al., 1986), et le chat HFMD (*Hypertrophic Feline Muscular Dystrophy*) identifié en 1989 (Carpenter et al., 1989).

# II.3.1. Le modèle murin : la souris « *mdx* » (*Muscular Dystrophy X-linked*)

La souris *mdx*, premier et principal modèle animal de la DMD (Chamberlain et al., 1988; Hoffman, 1991; Nonaka, 1998) a été décrite dans la lignée murine C57BL/10ScSn. Cette mutation, transmise sur le mode récessif lié au chromosome X, induisait des taux sériques élevés de créatine kinase (isoforme musculaire) mesurés au cours d'examens biochimiques de routine (Bulfield et al., 1984). Cette souche porte une mutation ponctuelle dans l'exon 23 qui provoque l'apparition prématurée d'un codon non-sens (Sicinski et al., 1989). Cette souche de souris ne présente pas de dystrophine dans les muscles (Ohlendieck and Campbell, 1991a). La souris *mdx* est l'espèce dystrophinopathe la moins sévèrement affectée, tant sur le plan clinique que lésionnel (Partridge, 1991a).

L'aspect extérieur de la souris *mdx* est normal, sans amyotrophie notable jusqu'à l'âge de 18 mois (De la Porte et al., 1999; Tanabe et al., 1986; Torres and Duchen, 1987). La faiblesse musculaire est minime (Nonaka, 1998; Partridge, 1991a). L'élévation des taux sériques de créatine kinase est importante dès les premiers jours de vie et ne décline que tardivement (taux normaux à un an), quand la nécrose musculaire diminue (Coulton et al., 1988). Selon certains auteurs, même âgée de 20-21 mois, la souris *mdx* développe une force musculaire comparable à celle des souris témoins (Bobet et al., 1998). Pour d'autres au contraire, la souris *mdx* âgée de plus de 20 mois (Hayes and Williams, 1998) ou 16 mois (Pastoret and Sebille, 1995) présente une faiblesse musculaire significative, et son poids diminue nettement après 52 semaines. Tardivement, une cyphose progressive accompagne la faiblesse et la fibrose des muscles

thoraciques et du diaphragme chez les souris âgées de plus de neuf mois (Laws and Hoey, 2004). Le diaphragme est alors le muscle le plus atteint (Stedman et al., 1991). Les souris *mdx* ne montrent pas ou peu d'atteinte myocardique (Coulton et al., 1988).

La durée de vie des souris *mdx* est de 20 à 24 mois, légèrement diminuée par rapport à celles de souris saines (30 mois) (Pastoret and Sebille, 1993).

Les souris *mdx*, faciles d'entretien et espèce animale d'expérimentation par excellence, sont extrêmement utiles pour l'étude de la fonction de la dystrophine et du complexe protéique associé, et les essais visant à prouver le bien-fondé d'une stratégie thérapeutique. Les possibilités de manipulation génétique dans cette espèce ont en outre permis la génération de nombreux modèles d'intérêt pathogénique.

# II.3.2. Le modèle canin : le chien « GRMD » (Golden Retriever Muscular Dystrophy)

Le chien Golden retriever atteint de dystrophinopathie est le modèle le plus proche de l'enfant dystrophique. Il existe plusieurs souches de chiens présentant des mutations dans le gène de la dystrophine. La souche la plus utilisée est celle décrite par Valentine et al. en 1986 et Kornegay et al. en 1988 (Kornegay et al., 1988; Valentine et al., 1986), appelée GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy), GXMD (Golden Retriever X-linked Muscular Dystrophy) ou CXMD (Canine X-linked Muscular Dystrophy).

La mutation qui affecte cette souche de chiens est une mutation ponctuelle (A vers G) du gène DMD, qui provoque la délétion de l'exon 7 (Sharp et al., 1992). L'exclusion de l'exon 7 déplace le cadre de lecture et introduit prématurément un codon stop dans l'exon 8 (Valentine et al., 1992). Un phénomène d'épissage alternatif permet la production d'une protéine tronquée, de 390 kDa, détectable par Western-Blot mais pas par immunohistochimie (Schatzberg et al., 1998). Le diagnostic génétique permettant la détection précoce des chiens affectés et femelles hétérozygotes dans les colonies GRMD est disponible et repose sur l'analyse des produits de PCR de l'exon 7 du gène DMD (Bartlett et al., 1996).

Le chien GRMD est cliniquement le modèle animal le plus proche de l'affection humaine. Cependant, la variabilité du phénotype est plus grande que chez l'enfant (Partridge, 1991a; Partridge, 1993).

Certains chiots GRMD présentent une forme néonatale mortelle dans les deux premières semaines de vie. La mort est liée à une nécrose musculaire généralisée, particulièrement marquée dans le diaphragme (Hoffman, 1991; Nguyen et al., 2002; Valentine et al., 1988).

La forme clinique classique de la dystrophinopathie du Golden retriever se caractérise par l'apparition chez des chiots de deux mois d'une atteinte musculaire primitive d'évolution progressive vers la mort (Kornegay et al., 1988; Valentine et al., 1986; Valentine et al., 1988). En phase d'état, l'affection se traduit par une démarche anormale (les membres sont raides, les foulées courtes, les deux postérieurs se déplacent simultanément donnant à la course un aspect de saut de lapin), des anomalies de posture (hyperextension du carpe, hyperflexion du tarse, cyphose lombaire...) et une amyotrophie généralisée précoce (Valentine et al., 1986; Valentine et al., 1988). Les chiots dès l'âge de trois mois présentent des régurgitations et une hypersalivation suite à une hypertrophie de la base de langue (Valentine et al., 1986; Valentine et al., 1986; Valentine et al., 1988) et de la musculeuse oesophagienne (Kornegay et al., 1988). Cette hypertrophie musculaire rend la mastication des aliments difficile et favorise l'apparition de pneumonie par fausse déglutition (Kornegay et al., 1988). Chez les chiens GRMD, l'espérance de vie ne dépasse pas les deux ans. La mort est spontanée ou une euthanasie est pratiquée en raison d'une insuffisance respiratoire majeure ou d'une insuffisance cardiaque terminale (hypocontractilité cardiaque, ascite, dyspnée).

Les lésions des muscles striés squelettiques et du muscle cardiaque sont très similaires à celles observées chez les garçons DMD. De plus, la taille des ces animaux, proche de celle des garçons DMD, en fait un modèle de choix pour étudier la faisabilité des approches de thérapie génique ou cellulaire (Howell et al., 1997). Le chien GRMD est également le seul animal modèle de la myopathie à présenter une atteinte myocardique semblable à celle observée chez les garçons DMD et à permettre une investigation à ce niveau-là. Cependant, le coût de l'élevage de ces animaux est très élevé et leur utilisation ne peut être qu'occasionnelle. De plus, les portées sont de taille réduite (la forme néonatale les diminue encore), et peu d'animaux atteignent l'âge adulte en raison de leur faiblesse.

# II.3.3. Le modèle félin : le chat « HFMD » (*Hypertrophic feline Muscular Dystrophy*)

La dystrophie musculaire féline hypertrophique, dystrophinopathie héréditaire décrite chez le chat, met l'accent sur la principale lésion musculaire macroscopique et histologique observée chez cette espèce : l'hypertrophie musculaire. Cette affection a été décrite chez une souche de chats portant une délétion du promoteur musculaire du gène de la dystrophine (Carpenter et al., 1989; Winand et al., 1994). Une très faible quantité de dystrophine est détectée dans leurs muscles (Gaschen et al., 1992).

Ces chats subissent une dégénérescence musculaire mais présentent une hypertrophie et une raideur généralisée. L'hypertrophie est due à l'augmentation de la taille des fibres et non de leur nombre. Un grand nombre de fibres sont calcifiées. Les chats développent une cardiomyopathie, mais leurs muscles ne sont pas atteints de fibrose (Gaschen et al., 1999).

Le phénotype des chats HFMD est très différent de celui des humains. Ces animaux présentent une ressemblance certaine avec la phase précoce de la DMD (hypertrophie des fibres et absence de fibrose). Cependant, l'absence de la dystrophine provoque la dégénérescence des fibres musculaires mais le remplacement du muscle par un tissu fibro-adipeux n'est pas observé dans cette espèce. Le modèle félin est donc particulièrement intéressant dans l'étude des facteurs de progression des dystrophinopathies (Gaschen et al., 1999).

# II.3.4. Validité et utilisation des modèles animaux dans les essais thérapeutiques

Toutes les espèces atteintes de dystrophinopathie subissent une dégénérescence des muscles striés squelettiques suite à l'absence de dystrophine. Pourtant, la même anomalie biochimique induit des phénotypes cliniques différents entre l'homme et les animaux atteints : invalidante et fatale chez l'homme et le chien ; peu invalidante et fatale chez le chat ; non invalidante chez la souris. L'analyse précise des lésions histologiques des dystrophinopathies a permis à Hoffman et Gorospe (1991) de proposer un schéma pathogénique de dystrophinopathie en deux phases intégrant l'homme et les trois espèces animales affectées (Hoffman, 1991).

#### Phase I : Les lésions élémentaires constantes des dystrophinopathies

La phase I de la pathogénie des dystrophinopathies regroupe l'ensemble des conséquences primaires de l'absence de dystrophine dans le muscle, et est commune, précocement, à toutes les espèces atteintes de dystrophie musculaire. La phase I correspond aux mécanismes pathogéniques depuis l'anomalie génétique jusqu'à la nécrose des fibres, suivies de l'invasion macrophagique et de la régénération. Les lésions constantes de la phase I sont : la hyalinisation, la nécrose, la régénération, la calcification et l'hypertrophie des fibres (Gaschen et al., 1992; Valentine et al., 1989).

#### Phase II : Les lésions progressives spécifiques de l'homme et du chien

La phase II comprend les mécanismes pathogéniques secondaires à la dystrophinopathie, mais évoluant indépendamment de l'absence de dystrophine vers une auto-aggravation. Les lésions de la phase II sont la fibrose et la déplétion progressive en cellules satellites, responsables d'un échec de la régénération musculaire et la perte progressive en tissu musculaire, remplacé par du tissu conjonctivo-adipeux. Cette phase II est observée chez l'homme, le chien et le diaphragme de souris mdx (Louboutin et al., 1993).

Le chien GRMD est celui qui développe la pathologie la plus proche de la myopathie de l'homme, avec une évolution histologique semblable, notamment la fibrose des muscles. Les chats HFMD et les souris mdx ont un phénotype général très différent de celui des humains. Ces deux modèles présentent une hypertrophie musculaire et leurs capacités de locomotion ne sont pas, ou peu, diminuées. Les chats présentent une atteinte du muscle cardiaque et décèdent prématurément des suites des atteintes respiratoires. Leurs muscles ne présentent pas de fibrose. Les souris mdx ne

développent pas d'atteinte cardiaque, ni respiratoire, et leur durée de vie est peu modifiée. Leurs muscles ne développent pas de fibrose, à l'exception du diaphragme. Ces deux modèles ne reproduisent que partiellement la physiopathologie observée chez les garçons atteints par la myopathie de Duchenne.

La compréhension de la pathogénie des dystrophinopathies est un préalable indispensable à l'établissement de nouvelles stratégies thérapeutiques. La pathogénie de ces affections est comprise depuis que de multiples études sont possibles sur les modèles animaux, en particulier la souris mdx. Dans le cadre d'essais précliniques, le chien GRMD est incontestablement le meilleur animal des dystrophinopathies, puisque le plus proche cliniquement et lésionnellement du phénotype DMD.

# II.4. Les stratégies thérapeutiques de la dystrophie musculaire de Duchenne

Les modèles animaux dystrophinopathes servent à valider de nouvelles voies thérapeutiques de la DMD (Allamand and Campbell, 2000; Collins and Morgan, 2003). De nombreuses stratégies sont envisagées, différant par leurs modalités d'application et leurs objectifs : stratégies correctrices (apport de la dystrophine), compensatrices (surexpression d'une protéine dont l'effet est bénéfique en l'absence de dystrophine) et palliatives (visant à ralentir les lésions). L'élaboration de concepts de thérapie palliative, visant à réduire la progression des lésions, repose sur les processus pathogéniques impliqués dans la progression des dystrophinopathies. La phase I est une cible thérapeutique pour les stratégies correctrices et compensatrices. Les lésions de phase II sont des cibles pour les essais thérapeutiques palliatifs (Hoffman, 1991). Finalement, les différentes stratégies visent toutes à ralentir la nécrose musculaire, arrêter la progression des lésions et augmenter la force musculaire.

# II.4.1. Traitements pharmacologiques

A l'exception des antibiotiques qui permettent de rétablir l'expression de la dystrophine, les autres traitements pharmacologiques ont principalement pour objectif soit de bloquer la protéolyse et l'inflammation des muscles, soit d'augmenter la régénération des fibres ou la masse musculaire en général.

#### **Aminoglycosides**

Des études menées *in vitro* et *in vivo* ont révélé que les antibiotiques de la famille des aminoglycosides (ex. : gentamicine) induisent l'expression de dystrophine par les fibres dystrophiques chez la souris *mdx* (Arakawa et al., 2003; Barton-Davis et al., 1999). Ils se fixent sur l'ARN ribosomal et perturbent la reconnaissance codon/anti-codon, permettant une traduction au-delà d'un codon stop prématuré, d'une dystrophine de longueur totale (stratégie de correction traductionnelle) (Howard et al., 2004; Howard et al., 2000; Kaufman, 1999). Cette approche ne serait applicable qu'à environ 5-10% des patients DMD (Kimura et *al.*, 2005; Politano et *al.*, 2003).

#### Glucocorticoïdes

L'emploi de glucocorticoïdes à long terme est actuellement le seul traitement efficace disponible pour les patients. Mais au vu des effets secondaires potentiels, leur emploi est parfois restreint. Des dérivés de la prednisolone moins toxiques (cas du déflazacort,) ont été testés chez la souris mdx (Muntoni et al., 2002). L'administration quotidienne de déflazacort a un effet bénéfique sur la force musculaire totale dès une semaine de traitement (Hudecki et al., 1993).

Dans le contexte dystrophinopathe, les corticostéroïdes exerceraient leurs actions par effet positif sur la myogenèse (Passaquin et al., 1993), effet anabolique ou inhibiteur de la protéolyse (Rifai et al., 1995), stabilisation du sarcolemme (Jacobs et al., 1996), normalisation du métabolisme calcique (Metzinger et al., 1995; Vandebrouck et al., 1999), effet immunosuppresseur limitant l'infiltration par les lymphocytes T cytotoxiques CD8+ (Kissel et al., 1991), et surexpression d'utrophine (Courdier-Fruh et al., 2002; Courdier-Fruh et al., 2003). Les glucocorticoïdes agissent également par effet anti-inflammatoire (Wehling-Henricks et al., 2004).

#### Anabolisants et facteurs de croissance

L'atrophie des myofibres est l'un des facteurs de la perte de force du muscle dystrophique. Les traitements visant à augmenter la masse musculaire sont basés sur l'utilisation de facteurs de croissance et d'anabolisants. Leur but est d'augmenter la production de muscles pour contrer la perte due à la nécrose (De Luca et al., 2003; Gregorevic et al., 2002). Administré chez la souris dy/dy génétiquement déficiente en laminine, l'IGF-1 (*Insulin-like growth factor-1*) augmente la force et la masse musculaires, normalise la proportion de fibres I et II et hypertrophie les myofibres (Lynch et al., 2001). Certains composés ont été validés chez la souris mdx pour augmenter la force musculaire : effets positifs de certains acides aminés (glutamine et alanine seules ou combinées), de l'hormone de croissance (effets médiés par l'IGF-1), de la prednisone (Granchelli et al., 2000) et du LIF (*Leukemia inhibitory factor*) (Hoffman and Dressman, 2001).

Enfin, en contrecarrant l'action de la myostatine par des anticorps spécifiques administrés par voie intrapéritonéale, un inhibiteur de la différenciation musculaire (Patel and Muntoni, 2004), les souris *mdx* montre une force musculaire accrue et une amélioration fonctionnelle, avec diminution de la nécrose, y compris dans le diaphragme (Bogdanovich et al., 2002; Bogdanovich et al., 2004).

### II.4.2. Thérapie génique

Les dystrophinopathies sont, en tant que maladies génétiques monogéniques, l'une des indications de la thérapie génique somatique. Les difficultés de la thérapie génique en matière de DMD comprennent l'obtention d'une diffusion large du transgène, d'une durée d'expression longue, d'un contrôle de l'expression (Clemens and Duncan, 2001). La thérapie génique se heurte toutefois au problème de la très grande taille du gène DMD d'où la conception de minigènes (6,3 kb) (Acsadi et al., 1991) et de microgènes (3,1 – 4,2 kb) de dystrophine, écourtés d'un certain nombre de domaines spectrine (Helderman-van den Enden et al., 2003; Liu et al., 2005; Sakamoto et al., 2002). Les études sont principalement axées sur le mode de délivrance de ces ADNc : injection intra-musculaire (Murakami et al., 2003) ou systémique (Zhang et al., 2004) ; et sur leur modalité d'expression : vecteurs lentiviraux (Quenneville et al., 2007), Adeno-Associated virus (Athanasopoulos et al., 2004; Judge and Chamberlain, 2005) ou plasmide nu (Braun, 2004).

Une autre stratégie vise à réparer l'ARNm en éliminant l'exon ou les exons défectueux en utilisant des oligonucléotides anti-sens. Le «saut d'exon» ou «exon-skipping» représente une approche alternative de la thérapie génique (ou post-génique) intéressante du à sa grande efficacité de restauration phénotypique chez la souris mdx (Goyenvalle et al., 2004; Lu et al., 2003; Quenneville et al., 2007). Cette approche consiste à éliminer l'exon mutant contenant le codon stop prématuré dans l'ARN au moment de l'épissage, et permet de rétablir la production d'une protéine tronquée mais fonctionnelle. Dans ce cas, le transfert de gène n'a pas vocation à être curatif, mais à transformer un phénotype DMD en un phénotype BMD léger ou asymptomatique.

Les sites cibles de la thérapie génique sont disséminés dans tout l'organisme : muscle strié squelettique et cardiaque, encéphale et muscle lisse. Que ce soit par le biais de plasmides, de virus ou d'oligonucléotides, le problème de l'acheminement à tous les muscles n'a pas encore été résolu. D'où l'idée, au moins pour atteindre plusieurs groupes musculaires d'un membre, d'employer une voie d'administration vasculaire (intraveineuse, intra-artérielle ou intracardiaque) (Howell, 1999). Une méthode simple d'administration intraveineuse de plasmides ou de siRNA (ARN double brin interférants) par augmentation de la pression hydrostatique veineuse s'est avérée efficace et non toxique chez la souris, le rat, le chien et le macaque (Hagstrom et al., 2004).

### II.4.3. Thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire a le même but que la thérapie génique, à savoir permettre la réexpression d'une protéine fonctionnelle dans les fibres musculaires. Le moyen d'introduire une copie sauvage du gène est différent : c'est l'introduction de cellules porteuses d'une copie fonctionnelle du gène de la dystrophine, capables de fusionner avec les fibres musculaires existantes (Fig.12). Leurs noyaux permettent la production de dystrophine qui va idéalement se répandre dans toute la fibre. Historiquement, les premiers essais de thérapie cellulaire de la DMD se sont fait par transplantation de myoblastes, descendants des cellules satellites musculaires après passage en culture cellulaire. Depuis, il existe différentes stratégies basées sur l'utilisation de cellules souches d'origine musculaire ou extra-musculaire. C'est ce que nous allons développer dans la suite.

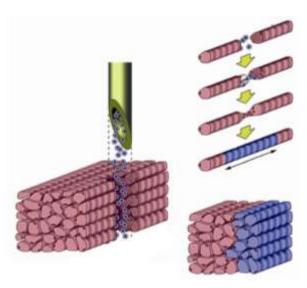


Figure 12 : Principe de la thérapie cellulaire dans les dystrophinopathies

La transplantation de cellules dans un muscle dystrophique (rose) est à la base de nouvelles thérapeutiques des dystrophinopathies. En fusionnant avec des fibres matures ou en cours de régénération d'un hôte, les cellules greffées pourraient contribuer à la formation fibres mixtes au sein desquelles le gène sain pourrait s'exprimer corrigeant ainsi l'anomalie génétique (Skuk and Tremblay, 2003).

# III. Les approches de thérapie cellulaire des dystrophinopathies

La thérapie cellulaire représente une approche intéressante pour le traitement de la DMD, car elle permet de créer un réservoir de cellules capables de fusionner avec les fibres et de restituer la dystrophine. En 1989, les premiers essais de thérapie cellulaire utilisés des myoblastes qui se sont révélés faiblement efficaces pour rétablir la dystrophine dans les fibres musculaires de la souris *mdx* (Partridge et al., 1989). Ces dernières années, des travaux ont indiqué que des cellules souches à fort potentiel régénératif sont présentes dans de nombreux tissus adultes et pourraient à terme être utilisées avec une meilleure efficacité.

# III.1. La transplantation de myoblastes

# III.1.1. Historique

La transplantation de myoblastes a initialement été utilisée dans des études développementales (womble and Bonner, 1980). L'observation de l'intégration des cellules transplantées ainsi que de l'expression de gènes allogéniques dans les fibres musculaires du receveur (watt et al., 1982; watt et al., 1984) a rapidement suggéré le potentiel thérapeutique de cette intervention dans le cadre de maladies musculaires dégénératives. Les premiers rapports décrivant une amélioration des caractéristiques biophysiques de muscles de souris dystrophiques par transfert de myoblastes datent de 1989 (Partridge et al., 1989).

Ces premières études chez la souris *mdx* ont révélé que l'injection de myoblastes sains, descendants *in vitro* des cellules satellites, étaient capables de générer des myofibres dystrophine-positives en quantité limitée. Ces études confirmèrent que la dystrophine pouvait être synthétisée *de novo* dans les fibres en régénération et se situer en position sarcolemmale (Huard et al., 1991a; Huard et al., 1991b; Karpati et al., 1989; Partridge et al., 1989). Les résultats encourageants du transfert de myoblastes dans ce

modèle murin de dystrophie musculaire ont motivé l'application rapide de cette technique à l'humain. Cependant, un grand nombre d'essais cliniques aboutirent à des résultats négatifs ou faiblement positifs (Gussoni et al., 1997; Gussoni et al., 1992; Huard et al., 1991a; Huard et al., 1992a; Law et al., 1990; Mendell et al., 1995; Tremblay et al., 1993). La dystrophine était observée à court et à moyen terme dans les muscles. Une certaine force musculaire était retrouvée par les patients. Cependant, le nombre de myofibres dystrophine-positives diminuait après 1 mois post-injection. Parallèlement, les résultats cliniques régressaient en corrélation avec la perte de la protéine.

Par contre, la transplantation cardiaque de myoblastes dans le contexte de la dysfonction ventriculaire post infarctus génère des résultats prometteurs. Des bénéfices fonctionnels de ces transplantations ont été démontrés dans de nombreux modèles animaux de différentes tailles (Al Attar et al., 2003; Ghostine et al., 2002; Jain et al., 2001) et ont aboutit à des études cliniques de phase I menées avec succès (Menasche et al., 2003).

### III.1.2. Aspects limitants de la transplantation de myoblastes

La reprise d'expériences chez le rongeur a permis de mettre en évidence plusieurs facteurs limitant le succès du transfert de myoblastes, tempérant l'optimisme initial entourant cette intervention dans le cadre des dystrophies. Le succès de la transplantation de myoblastes en tant que thérapie a été entravé par plusieurs problèmes dont les principaux sont : un faible taux de survie cellulaire ; une dissémination limitée des cellules injectées au sein du tissu receveur et une réponse immune spécifique dirigée contre les cellules transplantées.

#### III.1.2.1. Mortalité des myoblastes injectés

Le succès de la transplantation de myoblastes est limité par est un faible taux de survie cellulaire dû à la mort massive de cellules (75-90%) pendant les trois premiers jours suivant la transplantation (Fan et al., 1996; Guerette et al., 1997a; Huard et al., 1994b).

De nombreux facteurs affectant la survie des myoblastes transplantés ont été décrits. En particulier, il a été démontré que les conditions de culture permettant l'amplification des précurseurs myogéniques avant transplantation influencent leur survie *in vivo* (Smythe and Grounds, 2000). Ce problème est souligné par la greffe de fibres musculaires entières et de leurs cellules satellites. Les cellules greffées présentent alors une survie nettement améliorée par rapport à des cellules isolées à partir de biopsies et amplifiées *in vitro* (Fan et al., 1996). Les facteurs incriminés sont, entre autres, l'induction d'une réaction antigénique contre le sérum entrant dans la composition des milieux de culture (Boulanger et al., 1997), l'utilisation de facteurs de croissance (Kinoshita et al., 1995) ou l'altération des protéines de surface lors de la collecte des cellules au moyen d'enzymes protéolytiques (Smythe et al., 2000).

De plus, il a été suggéré que l'amplification de cellules *in vitro* ne présente pas d'avantage par rapport à l'injection de cellules purifiées directement après la procédure d'isolement. Montarras a mis au point une stratégie permettant d'isoler des cellules musculaires de souris pax3<sup>+</sup>/pax7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>. Ces cellules greffées dans des muscles de souris *mdx*, participent à la régénération des fibres lésées et redonnent de nouvelles cellules satellites. L'analyse a montré que la greffe de 20 000 cellules ainsi purifiées entraînait une régénération musculaire équivalente ou supérieure à celle obtenue précédemment avec 1.10<sup>6</sup> cellules musculaires provenant de cultures

cellulaires. Le pouvoir réparateur de ces cellules est expliqué par le fait qu'elles sont encore proches de leur état natif au moment de la greffe, ce qui leur confère une capacité supérieure de colonisation du muscle greffé.

### III.1.2.2. Dissémination des myoblastes injectés

L'approche la plus commune dans les protocoles de transfert de myoblastes consiste à transplanter les cellules au moyen d'injections intramusculaires localisées. Cette méthode présente l'avantage de pouvoir délivrer localement de grandes quantités de précurseurs myogéniques, ainsi que de créer, par le traumatisme qu'elle occasionne, un environnement favorable à l'incorporation des cellules greffées dans les fibres de l'hôte (Skuk and Tremblay, 2003). L'impact fonctionnel de cette technique est néanmoins limité.

Un problème rencontré lors du transfert de myoblastes est la migration restreinte des cellules transplantées, nécessitant le recours à des injections sériées, distantes de l'ordre du millimètre, afin de traiter un muscle cible (Skuk and Tremblay, 2003). Après la transplantation, les myofibres ayant incorporées les myoblastes greffés sont visibles à proximité du site d'injection : les cellules ne migrent pas à plus de 200 µm à 300 µm du point d'injection intramusculaire (Ito et al., 1998; Skuk et al., 1999). La distribution des cellules injectées est limitée spatialement par leur capacité restreinte à migrer à distance du lieu d'injection, aboutissant après fusion avec les fibres adjacentes à la formation de fines régions de fibres hybrides entourant le point de ponction (Skuk et al., 2002). L'expression de la dystrophine est observée sur 310 µm dans une fibre ayant incorporé un myoblaste (Gussoni et al., 1997). Cette observation a permis de définir le concept de domaine nucléaire correspondant au volume discret de cytoplasme d'une fibre dont le contenu est influencé par les transcrits provenant d'un noyau.

Cependant, des stratégies ont été développées pour améliorer la migration des cellules, notamment le prétraitement des myoblastes par divers facteurs de croissance. *In vitro*, De fortes concentrations de *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) sont utilisées pour augmenter la migration *in vivo* des myoblastes injectés (El Fahime et al., 2002; Kinoshita et al., 1995). Le bFGF a des effets positifs sur l'activité de l'urokinase plasminogen activator. Cette enzyme intervient dans la

migration des myoblastes selon trois mécanismes : (i) elle active des pro-métalloprotéinases (Saksela, 1985), qui accentue la capacité migratoire des myoblastes par remodelage de la matrice extracellulaire (El Fahime et al., 2000; Huard et al., 1994a; Kinoshita et al., 1995) ; (ii) elle dégrade elle-même certains constituants de la matrice extracellulaire (Saksela and Rifkin, 1988) ; (iii) elle active des facteurs comme le HGF ou scatter factor qui intervient de façon prépodérante dans la motilité cellulaire (Blasi et al., 1986). De même, la concanavaline A (ConA) est également une molécule activant l'expression de métalloprotéinases. L'addition de ConA au milieu de culture accentue l'aire occupée par les myoblastes après transplantation (Huard et al., 1994a).

Les injections intrapéritonéales ou intraveineuses de myoblastes, dans le but de distribuer les myoblastes à l'ensemble des territoires vascularisés de l'hôte sont restées sans succès (Partridge, 1991b). Lors d'injection intraartérielle, une fusion entre les cellules injectées et les fibres musculaires irriguées par ces artères a été mis en évidence mais dans des proportions restreintes (Neumeyer et al., 1992). Ces résultats aboutissent à une restriction des thérapies par transplantation de précurseurs myogéniques aux pathologies affectant un nombre de muscles restreint et bien délimité, comme la dystrophie musculaire des ceintures (Negroni et al., 2006).

# III.1.2.3. Réponse immunitaire de l'hôte

La réponse immunitaire de l'hôte représente un problème important dans les protocoles de transfert de myoblastes allogéniques, mais également autologue (Huard et al., 1992b). Si l'immunosuppression n'est pas correctement réalisée, les myoblastes sont rapidement éliminés dans les deux premières semaines (Guerette et al., 1994). Mais, l'utilisation d'immunosuppresseurs, comme la cyclosporine ou le tacrolimus (FK506), en plus de leurs effets indésirables, ne permet pas de bloquer adéquatement la réponse immune de l'hôte contre les cellules transplantées (Huard et al., 1994b; Kinoshita et al., 1996). En outre, la cyclosporine, utilisées comme immunosuppresseur dans la majorité des essais, induit l'apoptose des myoblastes au moment de leur différenciation (Hardiman et al., 1993; Hong et al., 2002).

Plusieurs études se sont par conséquent intéressées à la fonction des différents composants du système immunitaire lors du processus de transplantation, mettant en évidence l'implication du système du complément (Skuk and Tremblay, 1998), des systèmes d'histocompatibilité majeurs et mineurs (Harlan and Kirk, 1999), ainsi que des macrophages (Guerette et al., 1997a; Guerette et al., 1997b), des lymphocytes

(Guerette et al., 1995), des cellules dendritiques (Pimorady-Esfahani et al., 1997) et des cellules NK pour *Natural Killers* (Hodgetts et al., 2000) (Fig.13). Il apparaît que la modulation de chacun de ces éléments se répercute sur la survie des cellules transplantées, soulignant la complexité du processus de rejet après transplantation (Smythe et al., 2000).

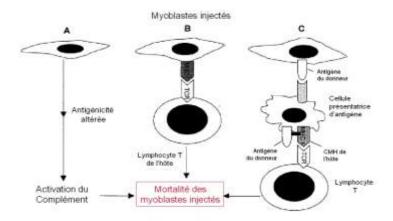


Figure 13 : Mécanismes majeurs expliquant la mortalité des myoblastes injectés

A. Les myoblastes injectés peuvent activer la voie du complément. B. En raison de l'implication des systèmes d'histocompatibilité majeurs et mineurs dans la greffe de cellules, les lymphocytes T de l'hôte peuvent exercer leur cytotoxicité directement sur les myoblastes injectés. C. La présence d'antigène du donneur sur les myoblastes injectés peut également entrainer une réponse T par l'intervention des cellules présentatrices d'antigènes. (Smythe et al., 2000)

### III.1.3. Recherches actuelles sur la transplantation de myoblastes

Diverses techniques sont utilisées pour améliorer l'efficacité de la transplantation de myoblastes; Par exemple, on peut induire un recrutement et une fusion des cellules greffées plus importante chez la souris mdx suite à des efforts physiques répétés post-injection (Bouchentouf et al., 2006). Le blocage de la myostatine, soit chez l'hôte (la souris mdx), soit dans les myoblastes injectés, améliore le succès de la transplantation. D'après ces résultats, l'inhibition de la myostatine pourrait donc améliorer la réussite d'une thérapie cellulaire par myoblastes chez des patients atteints de DMD ou d'autres dystrophies musculaires (Benabdallah et al., 2005). Enfin, une étude récente montre que l'addition de vitamine D3 au milieu de culture améliore nettement la survie et la greffe de myoblastes humains chez la souris SCID (Stephan et al., 2007).

Un des défis actuel dans le domaine du transfert de précurseurs myogéniques à but thérapeutique consiste à mettre au point des techniques permettant de distribuer largement les cellules, tout en minimisant la réaction inflammatoire de l'hôte. La mort rapide d'un large pourcentage de myoblastes peut être compensée par la transplantation d'un nombre élevé de cellules. En effet, l'injection de 30 millions de cellules par mm³ permet d'obtenir de bons résultats chez le primate (skuk et al., 1999). La faible migration des myoblastes requiert un nombre élevé d'injections intramusculaires (200 à 250 dans un faible volume de muscle) pour obtenir une intégration satisfaisante des cellules injectées. Ces solutions ne sont pas idéales mais permettant la restauration de la dystrophine dans 26 à 30% des fibres musculaires. Ces données ont été obtenus dans des essais cliniques récents (skuk et al., 2006; skuk et al., 2007). Cependant, ces résultats obtenus sur des patients myopathes ont nécessité un nombre important d'injections sériées (100 injections par cm² de muscle), distantes de l'ordre du millimètre. Un des patients a reçu un total de 4 000 injections intramusculaires.

La transplantation de myoblastes nécessite une immunosuppression à base de cyclosporine ou de tacrolimus. Cependant, l'usage de ces molécules peut à long terme être néfaste pour le patient. Une solution actuelle est de coupler la thérapie cellulaire par myoblastes à la thérapie génique afin d'envisager des transferts de cellules autologues modifiées. Des myoblastes contenant une microdystrophine transférée à l'aide d'un vecteur lentiviral ont été injectés avec succés chez la souris et le primate (Quenneville et al., 2007). Le gène complet de la dystrophine peut être introduit dans des

myoblastes en utilisant des vecteurs AAV (*Adeno-Associated Virus*) (Floyd et al., 1998; Goncalves et al., 2006b). Le projet Myoamp rassemblant des biologistes cellulaires, des cliniciens et des entreprises de biotechnologies de cinq pays européens (France, Italie, Suède, Allemagne et Angleterre) cherche à développer une nouvelle approche en intégrant le micro-gène U7 (codant la séquence anti-sens permettant le saut d'exon) dans des cellules souches myogéniques et à mettre en place les conditions préalables à de futurs essais cliniques dans la myopathie de Duchenne.

\*\*\*

Malgré la faible efficacité de la transplantation de myoblastes, cette thérapie a aujourd'hui atteint le stade clinique de phase I et constitue le traitement le plus avancé dans le cadre de la DMD. Le premier essai clinique avait pour but de démontrer l'efficacité de la transplantation de cellules myoblastes sains dans 1 cm³ de muscle de patients dystrophiques. Cet essai a pu montrer la restauration de la dystrophine chez ces patients (skuk et al., 2006). Un deuxième essai a débuté consistant à transplanter des myoblastes dans un muscle complet de l'avant bras. Il s'agit là des premières applications cliniques de cette stratégie thérapeutique. Cependant, ces essais restent basés sur un traitement de groupes musculaires localisés. Avec l'émergence des cellules souches adultes, l'efficacité de la thérapie cellulaire dans les muscles squelettiques pourrait être améliorée en utilisant des cellules spécifiques dérivées du muscle, de la moelle osseuse ou du tissu adipeux.

# III.2. Utilisation de cellules souches adultes

#### III.2.1. Définitions

En biologie, le terme de cellules souches désigne une cellule qui a la capacité de se diviser pendant des périodes indéfinies, souvent durant la vie de l'organisme. Dans des conditions appropriées, ou sous l'influence des bons signaux, une cellule souche peut donner naissance à divers types de cellules différenciées constituant un organisme. Ainsi, les cellules souches possèdent la capacité de se développer en cellules matures, qui présentent des formes caractéristiques et des fonctions spécialisées, comme les cellules cardiaques, les cellules de la peau, et les cellules nerveuses.

Quel que soit le tissu considéré, faute de critères de reconnaissance spécifiques, les cellules souches ne peuvent donc être identifiées que par leur fonction. Chris Potten donnait en 1990 la définition d'une cellule souche : «La fonction d'une cellule souche, c'est de proliférer et de créer, chez l'embryon, ou de pérenniser, chez l'adulte, la diversité des compartiments fonctionnels d'un tissu durant la vie de l'individu, en empruntant de multiples voies de différenciation» (Potten and Loeffler, 1990).

### III.2.1.1. Les différents types de cellules souches

On distingue plusieurs types de cellules souches selon leurs capacités de différenciation (Kirschstein, 2001).

#### Cellule souche totipotente

Les cellules souches totipotentes sont issues des premières divisions de l'œuf fécondé jusqu'au quatrième jour (morula de 2 à 8 cellules). Étymologiquement totipotence signifie "tout pouvoir" indiquant que théoriquement ces cellules peuvent être différenciées en tout type cellulaire de l'organisme qu'elles devaient conduire à former. Le type même de cellule souche totipotente est la cellule embryonnaire initiale, le zygote, qui est à l'origine de toutes les cellules de l'organisme, celles de l'embryon comme celles des annexes (placenta, membranes).

#### Cellule souche pluripotente

Les cellules souches pluripotentes peuvent se différencier en cellules des trois feuillets embryonnaires, le mésoderme, l'endoderme, et l'ectoderme. Elles ne peuvent ni aboutir à elles seules à la création d'un être vivant complet ni donner naissance aux tissus extra-embryonnaires comme le placenta (www.afm-france.org et www.irb.chu-montpellier.fr). Ces cellules sont isolées de la masse interne du blastocyste, structure formée à partir du stade 32 cellules lors du développement embryonnaire.

#### Cellule souche multipotente

Les cellules souches multipotentes sont présentes dans l'organisme adulte. Elles sont à l'origine de plusieurs types de cellules différenciées mais conservent leur capacité à s'autorenouveller. Les cellules souches multipotentes peuvent donner naissance à plusieurs types de cellules, mais elles sont déjà engagées dans une certaine direction (www.afm-france.org). Leur répertoire de différenciation est restreint aux types de populations cellulaires dont le tissu en question est constitué.

#### Progéniteurs cellulaires

D'un point de vue terminologie, il faut prendre garde à ne pas utiliser le terme de « cellule souche » pour les cellules qui, bien qu'étant capables de se différencier en un ou plusieurs types cellulaires, ne peuvent pas s'auto-renouveller de manière virtuellement infinie. C'est le cas notamment des cellules progénitrices, très fréquentes dans l'organisme qui ont des capacités de division limitées (Fig.14).

Un progéniteur cellulaire est présent dans un tissu fœtal ou adulte et est partiellement spécialisé. Il est apte à se diviser et donne naissance à des cellules différenciées (www.afm-france.org). Les chercheurs distinguent souvent les progéniteurs cellulaires des cellules souches adultes de la façon suivante : quand une cellule souche se divise, une des deux nouvelles cellules est souvent une cellule souche capable de se répliquer indéfiniment. En revanche, quand un progéniteur cellulaire se divise, il forme des cellules qui ne sont plus capables de se diviser. Les progéniteurs cellulaires remplacent les cellules lésées ou mortes, maintenant de ce fait l'intégrité et les fonctions du tissu.

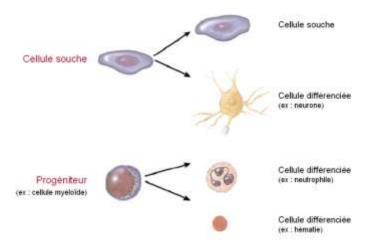


Figure 14 : Différences entre cellules souches et progéniteurs cellulaires

Contrairement à la cellule souche, le progéniteur cellulaire a une capacité de division limitée et donne naissance à des cellules différenciées (Kirschstein, 2001).

# III.2.1.2. Origine des cellules souches : Cellules souches embryonnaire, fœtale et adulte

Pour les recherches scientifiques ou médicales, les cellules souches (humaines et plus généralement de mammifères) peuvent être classées par rapport à leur origine (Fig.15) : embryonnaire, fœtale ou adulte.

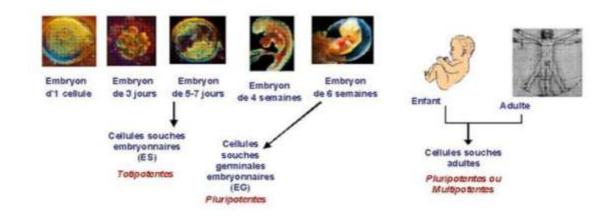


Figure 15 : Cellules souches embryonnaires et cellules souches adultes

La principale source de cellules souches embryonnaires (ES) est l'embryon de cinq à sept jours. Les cellules germinales (EG). peuvent aussi être extraites d'embryons plus âgés. Après la naissance, des cellules souches adultes peuvent être extraites de la plupart des tissus, y compris du cerveau et de la moelle épinière. La moelle osseuse et le sang du cordon ombilical sont particulièrement riches en cellules souches adultes. (
www.genethique.org)

#### Les cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires, aussi appelées cellules ES (de l'anglais *embryonic stem*), sont des cellules souches pluripotentes présentes dans l'embryon peu de temps après la fécondation (5 à 6 jours de développement) jusqu'au stade de développement dit de blastocyste où elles constituent la masse cellulaire interne (Fig.16). Ces cellules sont à l'origine de tous les tissus de l'organisme adulte et sont ainsi pluripotentes (Kirschstein, 2001).

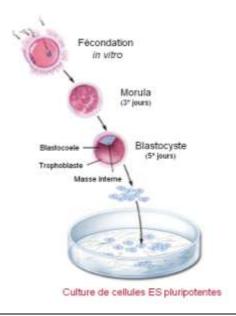


Figure 16 : Obtention de cellules embryonnaires ES

Au stade de blastocyste (5-jour de développement), les cellules ES sont extraites par dissociation de la masse interne du blastocyste. Elles peuvent alors être cultivées au laboratoire à l'infini tout en conservant leur caractère de "pluripotence" et en gardant un génome intact (Kirschstein, 2001).

#### Les cellules souches germinales

Les cellules souches germinales sont des cellules dérivées de tissus fœtaux. Elles sont isolées à partir cellules germinales primordiales contenues dans les éléments primaires de l'ébauche gonadique d'un fœtus de cinq à dix semaines. L'ébauche gonadique est à l'origine des testicules ou des ovaires et les cellules germinales primordiales se différencient en ovules ou en spermatozoïdes. Les cellules souches embryonnaires et les cellules souches germinales sont pluripotentes, mais elles ne sont pas identiques dans leurs propriétés et caractéristiques.

#### Les cellules souches fœtales

La cellule souche fœtale est un type de cellule souche multipotente d'origine fœtale. D'un point de vue recherche et thérapeutique, elles peuvent être prélevées sur des fœtus issus d'une interruption volontaire de grossesse. Les cellules souches fœtales ont la particularité d'être déjà orientées vers un type cellulaire particulier.

#### Les cellules souches adultes

Les cellules souches adultes sont des cellules indifférenciées que l'on trouve dans la plupart des tissus et organes adultes. Les cellules souches adultes sont rares (1 cellule médullaire sur 10 000 ou 15 000 est une cellule souche hématopoïétique). Ce sont généralement des cellules multipotentes. Elles sont capables de donner naissance à différentes lignées cellulaires d'un tissu donné. Une cellule souche adulte assure l'homéostasie, c'est-à-dire le maintien physiologique d'un organe ou d'un tissu, en remplaçant les cellules mortes, que ce soit naturellement ou après une lésion, assurant ainsi la pérennité de la fonction de l'organe pendant la vie de l'individu.

Des cellules souches adultes ont été identifiées avec certitude chez l'homme dans divers organes : cellules souches nerveuses (Gage, 2000), hématopoïétiques (Robin et al., 1999), épidermiques (Rochat et al., 1994), intestinales (Booth and Potten, 2000), osseuses (Bianco and Gehron Robey, 2000), pancréatiques, hépato-biliaires, musculaires lisses, musculaires squelettiques (Renault et al., 2000). Les cellules souches de trois tissus (sang, peau, intestin) fonctionnent en permanence, pendant la vie, pour renouveler régulièrement l'ensemble des cellules.

# III.2.2. Propriétés des cellules souches adultes

Une cellule souche est une cellule indifférenciée caractérisée par ses capacités : d'autorenouvellement (multiplication à l'identique pour produire de nouvelles cellules souches) et de
différenciation dans certaines conditions (pour engendrer les cellules spécialisées qui constituent les
différents tissus). Les cellules souches multipotentes, hébergées dans les tissus adultes, conservent
des capacités d'auto-renouvellement et peuvent donner naissance à plusieurs types de cellules : on
parle alors de plasticité cellulaire.

#### III.2.2.1. Auto-renouvellement

L'auto-renouvellement définie la capacité qu'ont les cellules souches de proliférer tout en maintenant leurs potentialités au fil des générations (Molofsky et al., 2004). Deux types d'auto-renouvellements sont possibles, symétrique ou asymétrique :

#### Modèle symétrique

Dans le modèle symétrique, chaque cellule souche se divise et génère deux cellules filles identiques et équivalentes entres-elles mais également par rapport à la cellule mère (Fig.13). Il s'agit du cas des cellules ES, qui s'auto-renouvelleraient de façon symétrique *in vitro* (Zwaka and Thomson, 2005). Le modèle symétrique permet une augmentation du capital de cellules souches. Il intervient au cours du développement embryonnaire précoce ou lors de lésion tissulaire.

#### Modèle asymétrique

Dans le modèle asymétrique, les deux cellules filles résultantes de la division de la cellule souche différeront phénotypiquement et n'auront pas le même destin : une cellule continuera à se diviser entretenant l'auto-renouvellement ; l'autre cellule s'engagera dans une voie de différenciation (Fig.17). Récemment, ce mode de division a été mis en évidence chez la souris, pour différents type de cellules tels que des cellules souches neurales (Karpowicz et al., 2005), des cellules musculaires en position « satellite » (Conboy and Rando, 2002; Shinin et al., 2006) et les cellules souches de l'épithélium intestinal ou de la glande mammaire (Potten et al., 2002; Smith, 2005). Le modèle asymétrique permet le maintien du capital de cellules souches ; ce modèle est adapté au renouvellement tissulaire normal.

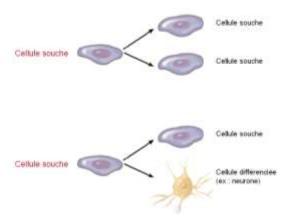


Figure 17 : Auto-renouvellement des cellules souches

Dans le modèle symétrique, chaque cellule souche se divise et génère deux cellules filles identiques et équivalentes entres-elles et à la cellule mère. Dans le modèle asymétrique, une cellule fille continuera à se diviser ; l'autre cellule fille s'engagera dans une voie de différenciation. (Kirschstein, 2001)

Conséquence de cette propriété, certaines cellules souches adultes se multiplient très efficacement en culture, en conservant intact leur "potentiel". Ce comportement in vitro n'est pas prédictif de leur potentiel prolifératif in vivo mais est essentiel pour leur manipulation dans un but thérapeutique.

### III.2.2.2. Plasticité, multipotence et transdifférenciation

Dans la littérature, par manque de consensus des définitions et concepts concernant les cellules souches, les notions de «multipotence», de «transdifférenciation» et de «plasticité» sont souvent amalgamées.

#### Plasticité

La plasticité est la capacité d'une cellule souche adulte d'un tissu de produire un (ou des) type(s) cellulaire(s) spécialisé(s) d'un autre tissu. Une cellule souche « plastique » a la possibilité d'acquérir différents programmes de différenciation. Plus le nombre de programme différents qu'une cellule souche est en mesure d'acquérir est élevé, plus elle sera « plastique ». Les notions de plasticité et de multipotence sont donc relativement proches. Un exemple récemment rapporté de plasticité est que, dans des conditions expérimentales spécifiques, les cellules souches adultes de la moelle osseuse peuvent produire des neurones (Mezey et al., 2000) et d'autres types cellulaires comme des hépatocytes (Lagasse et al., 2000).

#### Transdifférenciation

La transdifférenciation caractérise le processus par lequel un précurseur voire une cellule différenciée se transforme en une cellule différenciée d'un autre type cellulaire (de la Fuente et al., 2004; Real et al., 2006; Song and Tuan, 2004). Cela impliquerait que la cellule différenciée se dédifférencie en progéniteur. Le progéniteur, déjà déterminé dans un lignage, acquiert alors le programme d'un autre lignage. Il existe plusieurs exemples de ce processus chez la drosophile, ou la salamandre (Maves and Schubiger, 2003; Tanaka, 2003) mais il n'y a pas d'équivalent démontré chez les mammifères.

La démonstration qu'une population de cellules souches adultes existe dans un tissu différencié exige que ces cellules soient plastiques tout en donnant naissance à des cellules différenciées caractéristiques du tissu dans lequel elles sont implantées. Cependant, de nombreux résultats antérieurs qui plaidaient en faveur de la «plasticité » ou de la « transdifférenciation » de cellules souches adultes ont été partiellement réfutés car on suspecte maintenant que des phénomènes de fusion cellulaire puissent être responsables d'une partie au moins de ces observations. En effet, des cellules souches transplantées ont présenté une fréquence de fusion élevée avec les cellules du parenchyme tout en acquérant le phénotype de ces dernières, donnant l'illusion d'une plasticité (Garbade et al., 2005; Ishikawa et al., 2006; Spees et al., 2003; Terada et al., 2002; Ying et al., 2002).

### III.2.2.3. Marqueurs phénotypiques et fonctionnels

La rareté des populations de cellules souches dans un tissu impose un enrichissement préalable de ces populations pour pouvoir les étudier ou les utiliser. Or, une cellule « indifférenciée » ne présente pas les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des tissus adultes. La cytologie des cellules souches met en évidence un rapport nucléo-cytoplasmique élevé c'est-à-dire peu de cytoplasme, peu d'organelles et un noyau sphérique et proéminent (Baharvand and Matthaei, 2003; Johkura et al., 2004; Jouvion et al., 2006). Cet état peut être en soi considéré comme une caractéristique, une identité propre et matérialisé par l'expression d'une cohorte de marqueurs de surface et, par l'expression de facteurs de transcription garant de cet état souche. Ainsi, un grand nombre de critères purement phénotypiques, établis par des techniques immunohistochimiques, ont été développés pour caractériser une cellule et en déduire son potentiel.

La caractérisation des cellules souches s'effectue suite à une sélection négative permettant la séparation de cellules plus matures exprimant des marqueurs de différenciation, d'où l'appellation « *lineage-negative* » ou Lin-. Puis, selon une sélection positive basée sur l'expression commune de certains antigènes de surface. C'est le cas de Sca-1 (pour *Stem Cell Antigen*), c-kit, Thy-1, Flk-2, CD133 (ou AC133) et CD34 chez la souris (Sherwood et al., 2004). Mais, la variabilité d'expression de ces antigènes avec l'état d'activation de ces cellules rend leur utilisation délicate (Peister et al., 2004). De plus, certains antigènes ne sont pas utilisables d'une espèce à l'autre. C'est le cas du Sca-1 qui n'est connue que chez la souris. Les principaux marqueurs permettant de définir le phénotype des cellules souches adultes sont regroupés dans le tableau 3.

Marqueurs	Type cellulaire et/ou signification
CD34	Molécule de surface exprimé par :
	- les cellules souches hématopoïétiques (CSH)
	- les progéniteurs endothéliaux
	- les cellules satellites
	- les cellules souches dérivées du muscle (MDSC)
c-Kit	Récepteur au Stem Cell Factor (SCF) exprimé par les cellules souches hématopoïétiques (CSH)
Stem Cell Antigen-1	Molécule de surface connue uniquement chez la souris exprimé par :
(Sca-1)	- les cellules souches hématopoïétiques (CSH)
	- les cellules souches dérivées du muscle (MDSC)
	- les progéniteurs endothéliaux
CD45	Cellules d'origine hématopoïétique :
(Leucocyte Commun Antigen)	- les cellules souches hématopoïétiques (CSH)
	- les cellules lymphoïdes et myéloïdes
Stro-1	Antigène stromal exprimé par les cellules souches mésenchymateuses (CSM)
Thy-1	Molécule de surface exprimé par :
(CD90)	- les cellules souches hématopoïétiques (CSH)
	- les cellules souches mésenchymateuses
CD133	Molécule de surface exprimé par :
(AC133)	- les cellules souches hématopoïétiques (CSH)
	- les cellules souches circulantes
Fetal Liver Kinase-1	Récepteur au VEGF exprimé par :
(Flk-1)	- les cellules souches hématopoïétiques (CSH)
	- les cellules souches dérivées du muscle (MDSC)
	- les cellules endothéliales
Flt-3	Récepteur au Flt-3 ligand exprimé par :
	- les cellules souches hématopoïétiques (CSH)
	- les progéniteurs hématopoïétiques
	- les cellules stromales de la moelle osseuse
Pompe ATP-dépendante du type ABC (ABCG-2)	P-glycoprotéine exprimée par les cellules souches de la Side Population dérivé d'un grand nombre de tissus
Pompe MultiDrug Resistance-1 (MDR-1)	Molécules à l'origine de l'exclusion du hoeschst 33342
Marqueurs Lin (lineage)	Association de marqueurs définissant les cellules sanguines matures ; le phénotype lin- est caractéristique :
	- des cellules souches hématopoïétiques (CSH)
	- des progéniteurs hématopoïétiques

Tableau 3 : Principaux marqueurs utilisés dans la définition du phénotype des cellules souches adultes

La découverte chez l'adulte de cellules souches pouvant contribuer, de façon transitoire ou permanente, à la réparation de tissus comme ceux du foie, du muscle, du pancréas et du cerveau est une avancée majeure. A l'exception des cellules souches de la peau et du tissu hématopoïétique déjà utilisés avec succès en thérapeutique réparatrice, l'utilisation d'autres cellules souches tissulaires adultes est encore purement spéculative et ne repose que sur les résultats décrits chez des modèles animaux. La rareté des données actuellement publiées chez l'homme rend indispensable en revanche leur étude sur un plan fondamental. Dans cette approche, les chercheurs vont être confrontés à plusieurs obstacles : leur rareté, leur accès difficile, les difficultés qui s'attachent à leur purification et à leur culture. La difficulté première posée par la récolte des cellules souches adultes concerne leur localisation. L'absence de marqueurs spécifiques de ce type de cellules rend leur identification difficile.

### III.2.3 Essais de thérapie par cellules souches adultes

L'utilisation de cellules exogènes pour reformer un tissu défaillant (réparation) ou pour corriger un défaut génétique est une voie thérapeutique qui fait l'objet de recherche depuis de nombreuses années. L'utilisation de cellules souches, capables de se différencier en différents types cellulaires a été envisagée. Ces cellules pluripotentes présentent deux avantages par rapport aux myoblastes : elles ont une capacité de prolifération bien plus élevée et elles sont capables de migrer du système vasculaire jusque dans les tissus. L'expression de la dystrophine et la régénération des muscles est plus importante suite à l'utilisation de ces cellules (Peng and Huard, 2004). Dans le cadre de la thérapie cellulaire de la DMD, des cellules souches adultes issues du muscle, ainsi que des cellules non musculaires, ont été testées.

# III.2.3.1. Cellules souches d'origine musculaire

Différentes techniques ont été développées afin de permettre un fractionnement en sous populations de cellules musculaires possédant des propriétés biologiques caractéristiques. Ces techniques sont :

\_ la technique d'ensemencements successifs, nommée « *preplating* », permettant d'isoler des cellules à adhérence retardée nommées « *Muscle-Derived Stem Cells* » ou MDSC (Qu et al., 1998 ; Lee et al., 2000; Torrente et al., 2001 ; Qu-Petersen et al., 2002 ; Jankowski et al., 2004) ;

\_ le test d'exclusion d'un colorant d'ADN définissant la « Side Population » (Jackson et al., 1999; Gussoni et al., 1999; Asakura et al., 2002).

# III.2.3.1.1. Les cellules souches dérivées du muscle (MDSC)

Les études chez la souris *mdx* ont prouvé que des cellules souches dérivées du muscle, les MDSC (*Muscle Derived Stem Cells*; Qu-Petersen et al., 2002), participaient à la régénération des fibres musculaires squelettiques dans un contexte dystrophique et pouvaient potentiellement renouveler le compartiment de cellules satellites.

#### **Obtention**

Les MDSC sont obtenues par la technique d'ensemencements successifs, nommée «preplating» (Fig.18), développée principalement par le groupe de J. Huard. A l'origine utilisée pour éliminer les fibroblastes des cultures fraîches de cellules dérivées du muscle de souris (Rando and Blau, 1994), cette technique consiste en une série de transferts quotidiens de surnageant de culture permettant de séparer les cellules en fonction de leur vitesse d'adhérence. Son usage a permis d'isoler une population à adhérence retardée, les MDSC, qui ne se fixent au support qu'au bout de 5 jours de culture. Cette population est une population marginale représentant 1 à 2% de la population totale (Qu-Petersen et al., 2002).

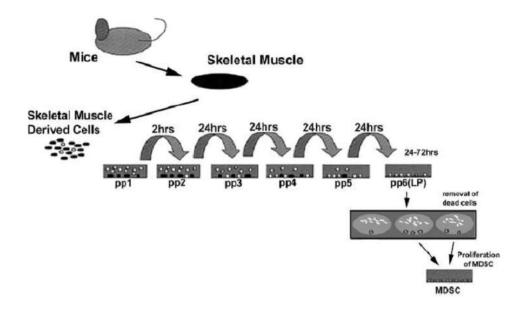


Figure 18 : Obtention de *Muscle-Derived Stem Cells* (MDSC) par la technique d'ensemencements successifs, nommée «*preplating*»

Une population de cellules souches a été isolée à partir du tissu musculaire de souris, sur la base d'un retard initial d'adhérence. Après ensemencement des cellules dérivées du muscle, la réalisation de transferts successifs de surnageant de culture permet d'isoler une fraction marginale de cellules qui adhèrent seulement après 6 jours. Qu-Petersen et al., 2002.

# Phénotype

Le phénotype des MDSC a été déterminé chez la souris (Lee et al., 2000; Qu-Petersen et al., 2002; Torrente et al., 2001). Le phénotype de ces cellules est très variable en fonction des différentes études (Tab.4). La forte proportion de cellules positives pour les marqueurs CD34 et Sca-1 sans exprimer le CD45 et le c-Kit indique que les MDSC sont des cellules souches non hématopoïétiques. D'autre part, les MDSC expriment précocement des marqueurs myogéniques membranaires tels que c-Met et des facteurs transcriptionnels régulateurs de la myogenèse tels que myoD. Enfin, 95% des cellules sont positives pour le Flk-1, antigène membranaire commun aux cellules souches hématopoïétiques et

endothéliales. Les MDSC pourraient être d'origine endothéliale. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les cellules Sca-1<sup>+</sup> dans le muscle murin sont étroitement juxtaposées aux capillaires et pourraient être assimilées aux péricytes.

	MDSC		
	(Qu-Petersen et al., 2002)	(Lee et al., 2000)	(Torrente et al., 2001)
CD34	+/-	-	+
Sca-1	+/-	+	+
Flk-1	+	+	ND
CD45	-	-	ND
c-Kit	-	-	ND
MNF	+	+	ND
myoD	+	+	ND
M-cadhérine	-	+/-	ND
c-Met	ND	+	ND
Myogénine	ND	+	ND
Desmine	-/+	+	ND
	Sca-1 Flk-1 CD45 c-Kit MNF myoD M-cadhérine c-Met Myogénine	CD34 +/- Sca-1 +/- Flk-1 + CD45 - c-Kit -  MNF + myoD + M-cadhérine - c-Met ND Myogénine ND	(Qu-Petersen et al., 2002)       (Lee et al., 2000)         CD34       +/-       -         Sca-1       +/-       +         Flk-1       +       +         CD45       -       -         c-Kit       -       -         MNF       +       +         myoD       +       +         M-cadhérine       -       +/-         c-Met       ND       +         Myogénine       ND       +

Tableau 4 : Phénotype des MDSC (*Muscle-Derived Stem Cells*) isolées à partir du tissu musculaire de souris

On remarque que l'identification phénotypique des MDSC est variable d'une étude à l'autre. +:>90%; +/-:40-80%; -/+:10-30%; -:<5% (Lee et al., 2000; Qu-Petersen et al., 2002; Torrente et al., 2001)

### **Propriétés**

Les MDSC se caractérisent en culture par une adhérence retardée au support. Les cellules restent légèrement en suspension où elles évoluent pendant plusieurs jours en colonies de cellules rondes, mononucléées. Cette forme évolutive est appelée « myosphère » (Nomura et al., 2007; Sarig et al., 2006).

Les MDSC ont un fort potentiel d'expansion *in vitro*. Elles sont capables de subir plus de 30 passages tout en maintenant leur signature phénotypique et caryotypique (Qu-Petersen et al., 2002). C'est pourquoi les MDSC sont également dénommée les *Long-Time proliferating cells* (LTP). Ces arguments sont en faveur d'une capacité d'auto-renouvellement *in vitro*.

La plasticité des MDSC a été évaluée par l'ajout de facteurs de croissance spécifiques. Les MDSC sont capables de se différencier en oligodendrocytes, en cellules endothéliales (Qu-Petersen et al., 2002), en ostéoblastes (Lee et al., 2000), en cardiomyocytes (Winitsky et al., 2005) et en cellules myéloides (Torrente et al., 2001). Les résultats obtenus *in vitro* ont été confirmés *in vivo* (Qu-Petersen et al., 2002).

### Potentiel thérapeutique

Les MDSC présentent une forte capacité de prolifération après greffe, une grande capacité d'auto-renouvellement et une meilleure survie post-transplantation qu'une population de myoblastes (Qu et al., 1998). Les essais de greffe de MDSC ont apporté la preuve de leur fonctionnalité chez la souris *mdx*. La présence prolongée de fibres musculaires hybrides a été notée. L'efficacité de la greffe de MDSC est dix fois supérieure à celle des myoblastes. Les MDSC n'exprimant pas les molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité, elles possèdent un statut immunitaire privilégié. Ainsi, les fibres hybrides dystrophine-positives ne sont pas la cible d'une infiltration lymphocytaire majeure (Qu-Petersen et al., 2002).

La population de MDSC co-exprimant le CD34 et le Sca-1 a été injectée par voie intra-artérielle chez la souris *mdx* (Torrente et al., 2001). Cette étude a montré que les MDSC peuvent traverser l'endothélium des capillaires du muscle et quittent la circulation sanguine pour participer à la régénération du muscle dystrophique. Mais, l'efficacité est de moins de 1% des fibres musculaires immunopositives pour la dystrophine dans les différents muscles. Leur capacité de dissémination par voie systémique reste limitée

Le succès de la transplantation des MDSC est variable. Des études récentes montrent que la survie après transplantation et la prolifération des MDSC sont dépendantes de l'âge et du sexe de l'animal donneur. En effet, la survie des MDSC obtenues à partir d'adulte est meilleure que celle de cellules de nouveaux nés (Lee-Pullen et al., 2004). De même, les cellules issues de femelles ont une capacité de régénération musculaire supérieure à celle des mâles (Deasy et al., 2007).

Enfin, les MDSC ont donné des résultats encourageants en transplantation intracardiaque dans un contexte d'ischémie myocardique ou de cardiomyopathie (Oshima et al., 2005; Payne et al., 2005).

En conclusion, les MDSC représentent une population d'intérêt en thérapie cellulaire des dystrophinopathies en raison de leur capacité de prolifération élevée, leur statut immunitaire privilégié et leur potentiel de régénération musculaire. Cependant, leur contribution à la restauration de la dystrophine reste limitée lorsqu'elles sont utilisées par voie systémique.

# III.2.3.1.2. Les cellules de la Side Population musculaire (mSP)

#### **Obtention**

Les cellules souches musculaires mSP pour *Side Population* ou population marginale, sont sélectionnées par exclusion du colorant Hoeschst 33342 (Fig.19), méthode initialement utilisée pour la purification des cellules souches hématopoïétiques (Goodell et al., 1996). Elles présentent une activité d'efflux permanent des xénobiotiques suite à l'expression de transporteurs ATP-dépendants de type ABC (gène ABCG2/BRCP1) (Bunting, 2002; Zhou et al., 2001). Cette propriété d'efflux, que traduit l'absence de fluorescence dans les spectres d'émission rouge et bleu après excitation du Hoechst par les ultraviolets, permet de purifier cette population appelée SP (*Side Population*). L'ajout de vérapamil, inhibiteur des pompes ABC entraînent la disparition de cette fraction. (Asakura, 2003; Goodell et al., 1996; Gussoni et al., 1999). Les mSP constituent la fraction cellulaire marginale, négative pour la rétention du colorant vital, représentant entre 0,2 et 2% (Gussoni et al., 1999; Jackson et al., 1999). A l'inverse, la population ne possédant pas les transporteurs ABC représente la fraction cellulaire majoritaire et positive pour la rétention du Hoeschst. Cette population est nommée la « Main population » musculaire (mMP).

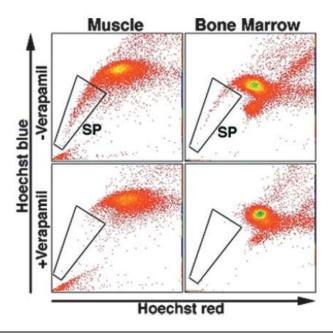


Figure 19 : Isolement des cellules de la *Side Population* à partir du tissu musculaire et de la moelle osseuse par FACS

En 1999, une fraction marginale de cellules souches a été isolée à partir du tissu musculaire squelettique et à partir de la moelle osseuse de souris sur la base de sa capacité à exclure un colorant vital, le Hoechst 33342. Les cellules faiblement fluorescentes n'ont pas été marquées en raison de l'activité des transporteurs ATP-dépendants de type ABC. Ces cellules sont appelées cellules de la *Side Population*. L'ajout de verapamil, inhibiteur des pompes ABC entraînent la disparition de cette fraction. (Asakura, 2003)

# Phénotype

Les cellules mSP représente une population hétérogène dont le phénotype (Tab.5) est très dépendant de la démarche expérimentale car il est modulé par concentration en colorant vital (Montanaro et al., 2004). C'est pourquoi, les résultats sont variables selon les études. Chez la souris, avec de fortes concentrations de Hoeschst, la majorité des cellules sont positives pour le Sca-1 et négatives pour les marqueurs de cellules souches hématopoïétiques, CD45 et c-kit (Asakura et al., 2002; Gussoni et al., 1999; Jackson et al., 1999). L'expression du CD34 est variable suivant les études. Enfin, les cellules mSP sont négatives pour l'expression de marqueurs myogéniques comme pax-7 et desmine (Asakura et al., 2002).

Chez l'homme, les cellules mSP ont été isolées à partir de muscle fœtaux. L'expression du CD133 est variable selon les études (Pavlath and Gussoni, 2005).

		mSP	mSP
		Souris	Homme
Marqueurs de cellules souches hématopoïétiques	CD34	+/-	+/-
Marqueurs de cellules souches hematopoletiques	Sca-1	+	*
	CD133	ND	+/-
	CD45	-	-
	c-Kit	-	-
Marqueurs myogéniques	Pax-7	_	ND
marquouro myogomquoo	Desmine	-	ND
Marqueurs endothéliaux	CD31	+/-	ND

Tableau 5 : Phénotype des mSP (Side Population musculaire) chez la souris et chez l'homme

+:>90%; +/-:40-80%; -/+:10-30%; -:<5%; ND: Non déterminé; \*: inexistant dans l'espèce (Asakura et al., 2002; Gussoni et al., 1999; Jackson et al., 1999; Montanaro et al., 2004; Pavlath and Gussoni, 2005)

# **Propriétés**

Les cellules mSP semblent être distinctes des cellules satellites. En effet, les mSP sont présentes chez la souris Pax-7<sup>-/-</sup>, qui présente un déficit sévère en cellules satellites (Seale et al., 2000). De plus, *in vitro*, les mSP ne s'engagent dans la lignée myogénique que si elles sont mises en présence de myoblastes par un système de co-cultures (Asakura et al., 2002). Toutefois, une fois injectées dans un muscle lésé, les cellules mSP sont capables d'engendrer des cellules exprimant Myf-5, Pax-7 et la desmine, marqueurs caractéristiques de cellules satellites (Asakura et al., 2002).

De nombreuses études ont prouvé le potentiel hématopoïétique des cellules mSP. En effet, les cellules mSP sont capables de reconstituer le répertoire hématologique de souris irradiées après injection intraveineuse (Gussoni et al., 1999; Jackson et al., 1999; Kawada and Ogawa, 2001; McKinney-Freeman et al., 2002). Les cellules mSP injectées reconstituent l'hématopoïèse de 10 à 14 fois plus efficacement que ne le fait la moelle osseuse, en termes de quantité de cellules sanguines produites Ces résultats ont également été menés *in vitro*. Dans des conditions de culture spécifiques, les cellules mSP donnent naissance à des cellules myéloïdes et lymphoïdes (Asakura et al., 2002). Le potentiel hématopoïétique des mSP résiderait dans la petite fraction (< 5%) de cellules exprimant le CD45 (McKinney-Freeman et al., 2002; McKinney-Freeman et al., 2003).

Enfin, Majka et al. (2003) ont montré que les mSP pouvaient participer à la revascularisation d'un muscle lésé en s'intégrant dans l'endothélium vasculaire (Majka et al., 2003).

# Potentiel thérapeutique

Des cellules mSP ont été administrées par voie intraveineuse chez la souris *mdx* totalement irradiée, présentant une faible capacité de formation de fibres musculaires hybrides. Cette greffe a permis l'expression de la dystrophine dans 3 à 9% des fibres musculaires 4 semaines post-injection (Gussoni et al., 1999). Les cellules mSP sont retrouvées également entre la membrane plasmique et la lame basale indiquant que ces cellules sont capables de générer des cellules satellites.

Récemment, il a été démontré qu'après injection intrartérielle *via* l'artère fémorale, les cellules mSP amplifiées *in vitro* participaient plus efficacement à la régénération du muscle dystrophique que les cellules mSP fraîchement isolées (Bachrach et al., 2006).

Un faible taux d'expression de dystrophine a été observé après injection intraveineuse de cellules souches musculaires SP transfectées *ex vivo* par un lentivirus portant une microdystrophine humaine, forme tronquée du gène initial de la dystrophine (Bachrach et al., 2004). Ces derniers essais ont toutefois indiqué qu'il est possible d'utiliser les cellules mSP pour atteindre plusieurs muscles et le diaphragme.

Ainsi, les cellules mSP ont présenté un grand intérêt lors de leur découverte et de nombreuses équipes ont cherché à les isoler et à les utiliser dans des protocoles de greffes cellulaires. Cependant, des résultats contradictoires ont été obtenus concernant leur phénotype et leur devenir in vivo après transplantation suite à des modifications du protocole expérimental. Ainsi, l'utilisation de ces cellules nécessite une optimisation et une standardisation des conditions expérimentales pour être appliquables à grande échelle.

# III.2.3.2. Cellules souches non musculaires

Le plus ancien traitement utilisant des cellules souches est la transplantation de moelle osseuse. Il est utilisé quotidiennement depuis les années 1970 pour les maladies du sang et du système immunitaire. À l'instar des cellules souches hématopoïétiques utilisées pour reconstituer les cellules sanguines, de nombreuses tentatives sont faites pour rechercher des cellules souches adultes, issues de la moelle osseuse, capables de réparer des tissus différenciés comme les muscles squelettiques.

Le tissu médullaire contient au moins deux types de cellules souches caractérisées : les cellules souches hématopoïétiques et les cellules souches mésenchymateuses (Fig.20). De plus, il existe des cellules souches associées aux vaisseaux et des cellules souches circulantes (progéniteurs tissulaires circulants) qui sont également à l'étude dans les essais de thérapie cellulaire du muscle dystrophique.

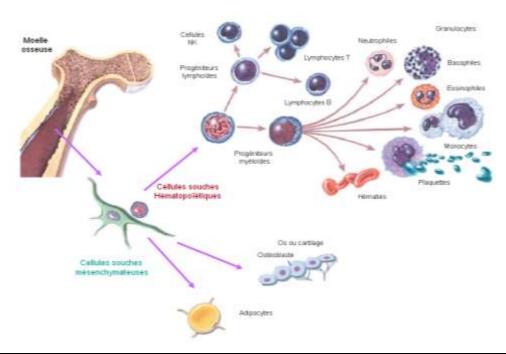


Figure 20 : Différentes populations de cellules souches identifiables dans la moelle osseuse.

Le tissu médullaire contient au moins deux types de cellules souches caractérisées : les cellules souches hématopoïétiques et les cellules souches mésenchymateuses. La moelle osseuse contient également la descendance des cellules souches hématopoïétiques, constituée par les progéniteurs et les cellules de la lignée myéloïde et lymphoïde. Les cellules souches mésenchymateuses sont définies par leur différenciation en adipocytes, ostéoblastes et chondroblastes (Domen, 2006).

# III.2.3.2.1. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH)

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) donnent naissance aux cellules sanguines matures (les globules rouges, les plaquettes, les monocytes, les granulocytes et les lymphocytes B et T) pendant la durée de vie de l'individu.

#### Obtention

Trois sources de cellules souches hématopoïétiques existent chez l'homme :

- la moelle osseuse chez l'adulte;
- le sang de cordon ombilical ou de placenta reconnu comme étant physiologiquement riche en CSH (Barker and Wagner, 2003; Koh and Chao, 2004) ;
- le sang périphérique des patients adultes traités par chimiothérapie et/ou par des cytokines, entraînant le passage des CSH dans la circulation.

Le développent du FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) a été crucial dans l'obtention et la purification de CSH avec l'utilisation d'anticorps monoclonaux reconnaissant des antigènes membranaires (par exemple, CD45 ou c-Kit). Cette technique a permis d'isoler des populations quantitativement minoritaires dans le tissu médullaire et aboutir la préparation de suspensions cellulaires fortement enrichies en cellules d'intérêt.

#### Phénotype

Un grand nombre de combinaisons de marqueurs moléculaires, sont utilisés pour définir les CSH chez la souris et chez l'homme. Ces marqueurs regroupent à la fois des molécules spécifiques de cellules souches et des antigènes présents à la surface de cellules sanguines telles les érythrocytes ou les macrophages : les marqueurs « lin » (Spangrude et al., 1988; Uchida and Weissman, 1992). Le CD45 est un des marqueurs le plus discriminant dans l'évaluation de l'origine hématopoïétique (Gussoni et al., 1999; Jackson et al., 1999; Lee et al., 2000). De plus, les CSH peuvent être définies par des activités métaboliques spécifiques mises en évidence par des colorants dont la rhodamine 123 (Spangrude and Johnson, 1990) ; et le Hoechst 33342, mettant en évidence l'activité des pompes ATP-dépendante du type ABC (Goodell et al., 1996) comme pour les cellules mSP.

En fonction des études, les combinaisons permettant de purifier les CSH peuvent varier (Tab.6). Chez la souris, les HSC semblent enrichies en cellules présentant le phénotype « KLS » pour c-Kit<sup>+</sup>, Lin<sup>-</sup> et Sca-1<sup>+</sup> (Orlic et al., 1993). Des CSH ne fixant pas la rhodamine 123 ont été purifiées (Kim et al., 1998) ainsi que des cellules SP (*Side Population*) ont été identifiées dans la moelle osseuse, sur la base de

l'exclusion du colorant Hoechst 33342 (Goodell et al., 1996). Cette population présente le phénotype suivant : les cellules SP de la moelle osseuse expriment Sca1, c-kit, CD45 et sont négatives pour lin et CD34 (Gussoni et al., 1999). Chez l'homme, des approches expérimentales similaires ont été menées en utilisant des marqueurs comme le CD34, le CD45, Thy-1, Lin et le CD133. Dans les greffes adjuvantes aux traitements anticancéreux, le CD34 et le Thy-1 semblent être les marqueurs les plus efficaces pour purifier les CSH chez l'homme (Michallet et al., 2000; Negrin et al., 2000; Vose et al., 2001). Chez le chien, les CSH sont c-Kit<sup>+</sup>, Lin<sup>-</sup> (Niemeyer et al., 2001).

	CSH	CSH	CSH	SP
	Souris	Homme	Chien	Souris
CD34	+	+	-/+	_
Sca-1	+	*	*	+
CD133	ND	+	ND	ND
CD45	+	+	-	+
c-Kit	+	ND	+	+
Thy-1 (CD90)	+/-	+	ND	ND
Rhodamine	+/-	ND	ND	ND
Hoeschst 33342		ND	ND	-
Lin	_	_	_	_
	CD133 CD45 c-Kit Thy-1 (CD90) Rhodamine	CD34 + Sca-1 + CD133 ND CD45 + c-Kit + Thy-1 (CD90) +/- Rhodamine +/- Hoeschst 33342	CD34 + + +  Sca-1 + * CD133 ND +  CD45 + +  c-Kit + ND  Thy-1 (CD90) +/- +  Rhodamine +/- ND  Hoeschst 33342 ND	CD34 + + -/+ Sca-1 + * * CD133 ND + ND CD45 + + - c-Kit + ND + Thy-1 (CD90) +/- + ND  Rhodamine +/- ND ND Hoeschst 33342 ND ND

Tableau 6 : Phénotypes des cellules souches hématopoïétiques (CSH) chez la souris, chez l'homme et chez le chien

+:>90%; +/-:40-80%; -/+:10-30%; -:<5%; ND: Non déterminé; \*: inexistant dans l'espèce. (Goodell et al., 1996; Gussoni et al., 1999; Kim et al., 1998; Michallet et al., 2000; Negrin et al., 2000; Niemeyer et al., 2001; Orlic et al., 1993; Vose et al., 2001)

#### **Propriétés**

Les cellules souches de la moelle osseuse injectées par voie intraveineuse repeuplent en grande mesure le tissu hématopoïétique : ces mécanismes de migration cellulaire sont appelés "homing". On dispose aujourd'hui d'informations qui prouvent la capacité de cette cellule à migrer et à se différencier dans d'autres tissus tels que le muscle (Ferrari et al., 1998; Gussoni et al., 1999; LaBarge and Blau, 2002), le myocarde (Orlic et al., 2001a; Orlic et al., 2001b), le système nerveux central (Mezey et al., 2000) et le foie (Lagasse et al., 2000; Petersen et al., 1999). Des cellules médullaires sont capables de se différencier en cellules hématopoïétiques, mais aussi de coloniser les tissus épithéliaux poumon, intestin, peau, et d'y exprimer des marqueurs épithéliaux (Krause et al., 2001). Ces observations résultent toutes d'une même

démarche expérimentale très classique, la transplantation à des rongeurs irradiés, par voie intraveineuse, d'une suspension de cellules extraites de la moelle osseuse. La plupart des animaux receveurs ont été irradiés afin d'éliminer les cellules hématopoïétiques endogènes qui ne permettraient pas l'établissement d'un chimérisme hématopoïétique témoignant de la présence de cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans le greffon.

# Potentiel thérapeutique

D'un point de vue pratique, la greffe de CSH ne pose aucun problème : les cellules du donneur sont très facilement collectées, et la greffe se fait par voie intraveineuse. Il existe trois situations pathologiques où les CSH sont utilisées dans un but thérapeutique :

\_ greffes allogéniques à partir des cellules d'un donneur apparenté sain : remplacement des CSH déficientes ou trop peu nombreuses ;

\_ greffe autologue de cellules hématopoïétiques, pas nécessairement "souches ", pour pallier les conséquences néfastes de la chimiothérapie et de la radiothérapie. Dans ce cas, il s'agit d'une démarche "transfusionnelle " surtout utilisée dans le traitement des tumeurs solides ;

\_ remplacement d'un gène déficient ou manquant par transfert de gènes dans des cellules souches hématopoïétiques autologues. Cette approche ne s'applique pour l'instant qu'à des pathologies très sélectionnées où existe un avantage prolifératif des cellules transduites.

L'injection dans la circulation de moelle osseuse totale mène à des évenements de régénération des fibres musculaires striées lésées expérimentalement par traitement à la cardiotoxine (Ferrari et al., 1998). Elles présentent l'intérêt de pouvoir accéder à un site de régénération musculaire à partir de la circulation sanguine et donc d'être utilisées par voie intravasculaire. Les premiers résultats de transplantation de CSH chez la souris *mdx* totalement irradiée étaient prometteurs. En effet, l'injection intraveineuse de 5.10<sup>5</sup> - 5.10<sup>7</sup> CSH a conduit à l'expression de dystrophine dans 1 à 10% des fibres du muscle tibial cranial à 12 semaines post-injection (Gussoni et al., 1999). Pour une quantité de cellules nettement inférieure (2000 à 5000), les cellules SP de la moelle osseuse permettent le rétablissement de la dystrophine dans 4% des fibres du tibial cranial, ce qui proportionnellement dénote une efficacité supérieure des cellules SP.

Cependant, chez un patient atteint simultanément de DMD et de syndrome d'immunodéficience combinée sévère (SCID) liée au chromosome X, il a été montré que, suite à une greffe de moelle osseuse, l'expression de la dystrophine persiste à long terme (12 ans) mais seulement 1 à 3% des fibres régénérées contiennent des cellules du donneur. Ce résultat est très éloigné d'un niveau

relevant sur le plan clinique (Gussoni et al., 2002). La greffe de CSH chez le chien GRMD a également été un échec (Dell'Agnola et al., 2004).

En conclusion, c'est autour du système hématopoïétique, dont la manipulation expérimentale in vivo est particulièrement bien maîtrisée, que l'on révèle actuellement des capacités de régénération inter-tissulaires variées. Il existe dans la moelle osseuse des cellules capables de migrer dans le foie ou le muscle, et dans ce dernier tissu, d'occuper la « niche » caractéristique des cellules satellites. Cependant, la valeur thérapeutique de ces observations potentiellement innovantes est mal précisée et doit faire l'objet d'études plus approfondies. Pour l'instant chez les petits rongeurs, l'effet thérapeutique de la différenciation musculaire de la cellule souche hématopoïétique injectée reste limité.

# III.2.3.2.2. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)

La moelle osseuse dite « rouge », siège de l'hématopoïèse, est constituée des cellules hématopoïétiques et d'un stroma nourricier assurant la cohérence du tissu médullaire. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules souches non hématopoïétiques présentent au sein des cellules stromales médullaires (Friedenstein et al., 1974). Il s'agit d'une nouvelle population de cellules souches multipotentes, dont la localisation n'est pas restreinte à la moelle osseuse. Elles ont été identifiées dans le tissu adipeux, le périoste, la membrane synoviale, le thymus, le placenta et même dans des organes dont le parenchyme est d'origine endodermique tels que le foie, le pancréas ou les poumons (Barry and Murphy, 2004).

# Définition d'une cellule souche mésenchymateuse

Selon l'ISCT (*International Society for Cellular Therapy*), le terme CSM désigne : « Toute population cellulaire obtenue à partir d'un tissu/organe ayant *in vitro* les caractéristiques minimales suivantes (Horwitz et al., 2005; Keating, 2006) :

- \_ adhérence au plastique, par opposition aux cellules hématopoïétiques ;
- \_ capacité à se différencier dans les types cellulaires du lignage mésenchymateux : différenciation « AOC » pour adipogénique, ostéogénique et chondrogénique.
  - combinaison d'expression des marqueurs de surface spécifiques (Tab.7).

Marqueurs de surface « ISCT »		Cellules souches mésenchymateuses (CSN	
CD105/ Endoglin/SH2	Récepteurs au TGF-β	+	
CD90/Thy-1	Cellules souches hématopoïétiques	+	
CD73	Cellules lymphoïdes	+	
CD45	Cellules souches hématopoïétiques	-	
CD34	Cellules souches hématopoïétiques	-	
CD19	Cellules lymphoïdes	-	
CD14	Récepteur au LPS	-	
CD11b/Intégrine Mac-1	Cellules myéloïdes et lymphoïdes	-	
HLA-DR/CMH-II	Complexe Majeur d'Histocompatibilité	-	

Tableau 7 : Phénotypes des cellules souches mésenchymateuses (CSM) chez l'homme d'après la définition de l'ISCT (*International Society for Cellular Therapy* )

Horwitz et al., 2005; Keating, 2006

# **Obtention**

Parmi les différentes cellules du stroma, certaines ont la capacité d'adhérer aux surfaces en conditions de culture classiques (milieu nutritif standard additionné de 10 à 20 % de sérum de veau fœtal). Dans ce milieu, les cellules différenciées du microenvironnement médullaire, telles que les ostéoblastes, les adipocytes ou les cellules endothéliales, ne prolifèrent pas et les cultures cellulaires s'enrichissent, au fur et à mesure des passages, de cellules d'allure fibroblastique ayant certaines caractéristiques des cellules musculaires lisses (Galmiche et al., 1993). Ces cellules sont capables de produire des colonies de cellules d'allure fibroblastique. Ces cellules ont été appelés CFU-F pour colony forming unit – fibroblast (Friedenstein et al., 1974).

# Phénotype

Selon l'ISCT, les cellules mésenchymateuses n'expriment pas les antigènes CD45 et CD34, à la différence des cellules hématopoïétiques. En revanche, elles expriment les antigènes CD90 (Thy1), CD105 (SH2) et CD73 (SH3). Le phénotype des CSM selon cette définition est donné dans le tableau 7. D'autres travaux montrent que les CSM sont positives pour les marqueurs suivants : STRO1, CD29, CD49a, CD44, CD71, CD106, CD120a et CD124 (Deans and Moseley, 2000; Minguell et al., 2001; Pittenger et al., 1999).

### **Propriétés**

La capacité de prolifération *in vitro* des CSM est très importante, dépassant celle des cellules hématopoïétiques et, dans certains cas, avec une stabilité étonnante de leur caryotype et de leur propriétés de différenciation (Rodriguez et al., 2005). Plusieurs publications démontrent que les CSM seraient, comme les cellules souches des autres systèmes, en phase Go du cycle cellulaire et posséderaient une activité télomérase élevée (Colter et al., 2000; Gronthos et al., 2003).

Par ailleurs, les CSM sont des cellules multipotentes, capables de produire *in vitro* des ostéoblastes, des chondrocytes et des adipocytes, selon les conditions expérimentales (Barry and Murphy, 2004). La formation de myotubes, révélant une différenciation myogénique, peut être obtenue par l'ajout de 5-azacytidine ou d'amphotéricine B aux conditions de culture (Phinney et al., 1999; Taylor and Jones, 1982; Wakitani et al., 1995). Les CSM peuvent également contribuer à la génération de myotubes en présence de myoblastes en différenciation par fusion cellulaire (Di Rocco et al., 2006; Goncalves et al., 2006a). De même, il a été montré que des facteurs solubles sécrétés par les myoblastes en différenciation pouvaient promouvoir l'expression de protéines spécifiques du muscle par une population de CSM isolées à partir du tissu adipeux (Di Rocco et al., 2006).

L'implication des cellules mésenchymateuses dans le soutien de l'hématopoïèse est connue depuis de nombreuses années et est couramment utilisée en laboratoire, dans un modèle *in vitro* de culture à long terme de cellules hématopoïétiques (Breems et al., 1994; Sutherland et al., 1990). En effet, les cellules mésenchymateuses sécrètent un ensemble de cytokines et de facteurs de croissance indispensables à la prolifération et à la différenciation des cellules hématopoïétiques.

Plusieurs études *in vitro* ou *in vivo*, aussi bien chez l'animal que chez l'homme, ont mis en évidence l'influence des CSM sur la réponse immunitaire T en exerçant des propriétés immunosuppressives (Aggarwal and Pittenger, 2005; Rasmusson, 2006). *In vivo*, l'administration de CSM, réalisée en même temps qu'une greffe cutanée allogénique, prolonge la durée de celle-ci de manière significative chez le primate (Bartholomew et al., 2002).

# Potentiel thérapeutique

Les caractéristiques spécifiques des CSM, comme leur fort potentiel prolifératif et leur capacité à se différencier en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes, font d'elles un outil attrayant dans la médecine régénératrice. Des études ont montré que les CSM dérivées de la moelle osseuse (Goncalves et al., 2006a) et de la membrane synoviale (De Bari et al., 2003) pouvaient contribuer à la régénération du muscle squelettique *in vivo* et participer à la restauration du pool de cellules satellites. Ces cellules permettent la restauration de la dystrophine dans les muscles de la souris *mdx*.

Dernièrement, de nombreuses études ont cherché à évaluer le potentiel myogénique des CSM isolées à partir du tissu adipeux : les ADSC (*Adipose-derived stem cells*). En effet, le tissu adipeux est une source particulièrement intéressante de cellules pour la thérapie cellulaire. Ce tissu représente environ 10% du poids corporel chez un individu adulte sain et jusqu'à 50% chez des individus obèses. Il est prélevé sans grande difficulté et dommage majeur pour le patient par les techniques de liposuccion qui sont effectuées en routine sous anesthésie locale. Les résultats obtenus chez la souris *mdx* sont très encourageants. 180 jours après l'injection d'ADSC humaines, 90% des fibres musculaires sont dystrophine positives. Les fibres nécrotiques sont absentes révélant un rôle protecteur sur le tissu musculaire des cellules greffées. Ces résultats peuvent être reproduits chez des souris immunosupprimées ou non, mettant en exergue le comportement immun privilégié de ces cellules (Rodriguez et al., 2005).

Le potentiel des CSM suscite un intérêt grandissant pour leur utilisation en thérapie cellulaire, soit pour leur capacité à soutenir l'hématopoïèse, soit pour leur pouvoir de réparation tissulaire, soit pour leur fonction immunomodulatrice de la réponse T. De par son importance quantitative, son accessibilité aisée (notamment le tissu adipeux sous-cutané) et l'image négative dont il bénéficie chez le grand public, le tissu adipeux est un candidat de choix pour l'obtention de cellules souches adultes aux perspectives de thérapie cellulaire.

# III.2.3.2.3. Les cellules souches associées aux vaisseaux : mésoangioblastes et péricytes

Dès le début du XXe siècle, le terme d'hémangioblastes a été utilisé pour décrire les amas de cellules mésodermiques qui, chez l'embryon, donnent naissance aux premiers vaisseaux contenant les premières cellules hématopoïétiques, adhérant en foyers à l'endothélium. L'existence de cellules endothéliales embryonnaires donnant naissance à des cellules hématopoïétiques au cours du développement embryonnaire précoce est donc une notion ancienne. L'existence de cellules souches associées aux vaisseaux a été confirmée par la description d'un autre type cellulaire candidat pour la thérapie cellulaire des dystrophies musculaires par voie vasculaire : le mésoangioblaste. Il s'agit d'une cellule souche des vaisseaux sanguins fœtaux et adultes capables de différenciation en plusieurs lignées mésodermiques (De Angelis et al., 1999; Minasi et al., 2002).

Cependant, la distribution anatomique naturelle dans la paroi vasculaire du fœtus et de l'adulte de telles cellules souches restent à préciser. En effet, des travaux récents réalisés chez l'homme, suggèrent que des cellules à haut potentiel myogénique pourraient être localisées au sein de l'endothélium (cellules myo-endothéliales) mais également en position périvasculaire parmi les péricytes. Les péricytes entourent et stabilisent l'endothélium des vaisseaux capillaires (Andreeva et al., 1998). Grâce à leurs propriétés contractiles, ces cellules jouent un rôle dans la régulation des échanges entre le compartiment sanguin et le secteur interstitiel en modifiant le calibre des vaisseaux capillaires (Betsholtz et al., 2005). La population de péricytes contiendraient des progéniteurs de tissus mésodermiques divers, comme des adipoblastes, des ostéocytes, des chondroblastes, ou des odontoblastes (Alliot-Licht et al., 2005; Farrington-Rock et al., 2004).

### Les mésoangioblastes

#### Obtention

Les publications relatant l'extraction de mésoangioblastes sont souvent très peu détaillées quant à la technique d'obtention de ces cellules, technique qui de plus varie suivant l'espèce considérée ou suivant les expérimentateurs. A l'origine, les mésoangioblastes ont été isolés à partir de l'aorte dorsale d'embryons de souris de 9,5 jours, stade 22-24 somites, par digestion enzymatique ou explantation suivie de culture clonale (De Angelis et al., 1999). Chez l'homme et chez le chien, les mésoangioblastes peuvent être obtenus à partir de biopsies musculaires (Morosetti et al., 2007; Sampaolesi et al., 2006). Les petits vaisseaux sont alors disséqués et mis en culture. Des cellules rondes et faiblement adhérentes sont isolées et cultivées en présence de facteurs de croissance : FGF, EGF, PDGF (Morosetti et al., 2006; Sampaolesi et al., 2006).

# Phénotype

Les mésoangioblastes expriment des marqueurs myogéniques, ainsi que des marqueurs de cellules endothéliales (De Angelis et al., 1999). Les clones dérivés de l'aorte dorsale embryonnaire de souris sont positifs pour la m-cadhérine, MNF, MyoD, Myf-5 et la desmine (Tab.8). Ces clones co-expriment le CD34 au début de leur expansion clonale. Ces cellules sont positives pour des marqueurs endothéliaux tels la VE-cadhérine, le récepteur-2 au VEGF (VEGF-R2) et la P-sélectine. Les analyses du transcriptome des mésoangioblastes ont montré que ces cellules expriment la E-sélectine, la β7-intégrine, des récepteurs pour de nombreuses cytokines et le CD44 (Tagliafico et al., 2004). Concernant les marqueurs utilisés couramment pour définir les cellules souches, les mésoangioblastes isolés à partir de vaisseaux sanguins embryonnaires de souris expriment les marqueurs CD34, Sca-1, Thy-1 et de manière transitoire Flk-1 et c-Kit (Minasi et al., 2002).

		Mésoangioblastes		es
		Souris	Homme	Chien
Marqueurs de cellules souches	CD34	+	_	_
hématopoïétiques	Sca-1	+	*	*
• •	CD133	ND	-	ND
	CD45	ND	-	_
	c-Kit	+/-	-	_
	Thy-1 (CD90)	+	+	ND
	Flk-1	+/-		
Marqueurs myogéniques	MNF	+	ND	ND
	myoD	+	-	ND
	Myf-5	+/-	ND	ND
	M-cadhérine	+	ND	ND
	c-Met	+	ND	ND
	Desmine	+	+	ND
Marqueurs de vaisseaux sanguins	lpha-Actine lisse	+	+	ND
	VE-cadhérine	+	ND	ND
	VEGF-R2	+	ND	ND
	P-sélectine (CD62P)	+	ND	ND
	L-sélectine (CD62L)	ND	-	ND
	α M-Intégrine (CD11b)	+	ND	ND
	β3-Intégrine (CD61)	+	ND	ND
	PECAM (CD31)	-	-	-
Autres	CD44	+	+	+
	CD13		+	+
	CD49b		+	ND
	Phosphatases alcalines		+	ND

Tableau 8 : Phénotype des mésoangioblastes chez la souris, chez l'homme et chez le chien

<sup>+:&</sup>gt;90%; +/-:40-80%; -/+:10-30%; -:<5%; ND: Non déterminé; \*: inexistant dans l'espèce. (De Angelis et al., 1999; Minasi et al., 2002; Morosetti et al., 2006; Sampaolesi et al., 2006; Sampaolesi et al., 2003; Tagliafico et al., 2004)

Chez l'homme, les mésoangioblastes dérivés des vaisseaux de biopsies musculaires expriment le CD44, le CD13 et le CD49b. Ces cellules sont négatives pour le CD34, le CD133 et le CD45 (Dellavalle et al., 2007; Morosetti et al., 2006). Par Western blot, l'expression de la vimentine, de l'α-actine lisse et de la desmine a été mise en évidence. De plus, les mésoangioblastes humains possèdent une forte activité des phosphatases alkalines (Morosetti et al., 2006).

Chez le chien, les mésoangioblastes expriment le CD44 and CD13 mais sont négatifs pour le CD34, le CD45, le c-Kit et le CD31 (Sampaolesi et al., 2006).

# Propriétés

Les mésoangioblastes sont doués de grandes capacités de migration extravasculaire. Ils migrent à travers l'endothélium en réponse à des cytokines libérées par le muscle telles que le TNF-α (Tumor Necrosis Factor) et le SDF-1 (*Stromal-Derived Factor*) ou en réponse à la libération par les fibres nécrotiques de HMBG-1 (*High Mobility Group Box-1*), protéine nucléaire chimiotactique (Galvez et al., 2006; Palumbo and Bianchi, 2004).

Les mésoangioblastes peuvent se différencier en muscles lisses et ostéoblastes en présence de TGFβ1 et BMP2 respectivement (Tagliafico et al., 2004). Ils se différencient en muscle squelettique ou en cardiomyocytes en co-culture. Cultivés sur matrigel et avec un faible pourcentage en sérum, ils se différencient spontanément en muscle squelettique (Minasi et al., 2002).

#### Potentiel thérapeutique

Les mésoangioblastes sains ou génétiquement modifiés peuvent être administrés par voie intravasculaire. L'injection intra-artérielle de mésoangioblastes transfectés *ex vivo* par un vecteur lentiviral a permis l'expression d'alpha-sarcoglycane et la restauration du complexe associé à la dystrophine chez la souris KO alpha-sarcoglycane, modèle de la dystrophie musculaire des ceintures (LGMD-2D) (Sampaolesi et al., 2003). Le pré-traitement des mésoangioblastes avec du TNF-α et du SDF-1, avant d'être injectées *via* l'artère fémorale, permet de doubler leur migration *in vivo*. De même l'expression transitoire de l'α4-intégrine associée à l'exposition *in vitro* au SDF-1 permet l'expression de sarcoglycane dans plus de 80% des fibres musculaires (Galvez et al., 2006).

L'injection intra-artérielle réitérée de mésoangioblastes chez le chien GRMD a montré des résultats étonnants avec plus de 70% de fibres dystrophine-positives dans tous les muscles explorés. Ces résultats sont associés à une amélioration significative de la motricité chez certains chiens traités (Sampaolesi et al., 2006).

Récemment, une étude a démontré qu'un sphingolipide physiologiquement présent dans le sérum, la sphingosine 1-phosphate, pouvait stimuler la prolifération des mésoangioblastes et inhiber leur apoptose (Donati et al., 2007). Ces résultats sont particulièrement importants à considérer étant donné que la survie souvent réduite des cellules souches après leur transplantation *in vivo* est en partie responsable de leur capacité seulement partielle de restauration des tissus lésés.

### Les cellules myo-endothéliales et les péricytes

Des arguments très récents suggèrent que des cellules endothéliales embryonnaire sont capables de produire en culture des cellules sanguines (Oberlin et al., 2002; Tavian et al., 2005; Zambidis et al., 2006). Des travaux décrivent un potentiel myogénique de certaines cellules endothéliales isolées à partir de muscle humain. Ces cellules, nommées les cellules myo-endothéliales, expriment le CD56, le CD34, le CD133 et sont négatives pour le CD45. Les cellules myo-endothéliales sont capables de régénérer des fibres musculaires après injection intramusculaire chez la souris SCID traitées à la cardiotoxine (Peault et al., 2007).

Parallèlement, des études révèlent la capacité des péricytes à générer *in vitro* et *in vivo* les types cellulaires du lignage mésenchymateux, c'est-à-dire adipocytes, chondrocytes, ostéocytes et odontoblastes (Alliot-Licht et al., 2005; Collett and Canfield, 2005; Farrington-Rock et al., 2004; Schor et al., 1990). Les péricytes, cellules quiescentes *in vivo*, sont des cellules n'exprimant pas les marqueurs de surface CD34, CD31, VE-cadhérine et CD45. Par contre, les péricytes sont positifs pour l'antigène CD146. Des péricytes CD146<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD56<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>, isolés à partir de muscle humain, possède des capacités myogéniques *in vitro* et *in vivo* (Peault et al., 2007).

Il existe donc des cellules souches au sein de la paroi des vaisseaux sanguins embryonnaires et adultes. Ces cellules peuvent être d'origine endothéliale ou péricytaire. Ces cellules sont capables de régénérer les fibres musculaires dans un contexte de dystrophinopathie. Elles expriment simultanément des marqueurs de cellules endothéliales et de cellules myogéniques à un stade de leur différenciation. Les différentes études décrivant ce type de cellules montrent qu'une filiation pourrait exister entre les lignées mésenchymateuses, vasculaires et hématopoïétiques restent encore difficiles à établir. Toutefois, les résultats obtenus chez le chien GRMD avec les mésoangioblastes et surtout ceux obtenus chez la souris KO alpha-sarcoglycane sont prometteurs.

# III.2.3.2.4. Les cellules souches circulantes : les AC133<sup>+</sup>

Des cellules souches à potentiel myogénique, identifiables par l'expression de l'antigène AC133 (ou CD133), ont été mises en évidence dans le sang circulant humain. Il s'agit de précurseurs endothéliaux et hématopoïétiques capables de reconstituer une population de cellules satellites après injection intra-artérielle chez la souris SCID/mdx (Torrente et al., 2004).

#### **Obtention**

Les cellules sont identifiables par l'expression de l'antigène AC133 dans le sang circulant. Leur isolement s'effectue par un simple tri à l'aide de sur colonnes de séparation par billes électromagnétiques (MACS, Miltenyi Biotech) (Torrente et al., 2004).

# Phénotype

L'antigène AC133<sup>+</sup> est un polypeptide glycosylé présent sur les CSH CD34 positives et sur les précurseurs circulants endothéliaux (Bhatia et al., 1998; Gallacher et al., 2000; Yin et al., 1997). Fraichement isolées, les cellules AC133<sup>+</sup> sont positives à 92% pour l'expression du CD34, à 95% pour le CD45 et à 95% pour le Thy-1. Ce phénotype signe fortement leur origine hématopoïétique (Tab.9).

Après 24 heures en culture, les cellules AC133<sup>+</sup> expriment des marqueurs myogéniques précoces, tels Pax-7, Myf-5, MyoD, M-cadhérine, MRF4, et la myogénine (Torrente et al., 2004).

De plus, les cellules AC133<sup>+</sup> expriment une série de molécules nécessaires à l'adhésion aux cellules endothéliales traduisant leur capacité de migration extravasculaire: CD44, LFA-1 (*Lymphocyte Function Antigen-1*), Ligand de la P-sélectine, L-sélectine et VLA-4 (*Very Late Antigen-4*). L'expression de ces molécules explique le succès des cellules AC133<sup>+</sup> lors de leur transplantation. En effet, dans le muscle dystrophique, les cellules endothéliales surexpriment l'antigène VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*). Les interactions entre VACM-1 et le VLA-4 sont à l'origine de la diapédèse des cellules AC133<sup>+</sup> (Gavina et al., 2006). De façon similaire, la L-sélectine joue un rôle primordial dans la migration extravasculaire des cellules souches injectées par voie systémique (Torrente et al., 2003).

		AC133	
		Homme	
Marqueurs de cellules souches	CD34	+	
hématopoïétiques	Sca-1	*	
	CD133	+	
	CD45	+	
	c-Kit	ND	
	Thy-1 (CD90)	+	
	Flk-1	ND	
Marqueurs myogéniques	Pax-7	+	
	myoD	+	
	Myf-5	+	
	M-cadhérine	+	
	MRF-4	+	
	Myogénine	+	
Marqueurs de vaisseaux sanguins	P-sélectine (CD62P)	+	
	L-sélectine (CD62L)	+	
Autres	CD44	+	
	LFA-1	+	
	VLA-4	+	

Tableau 9 : Phénotype des cellules AC133 positives chez l'homme

+:>90%; +/-:40-80%; -/+:10-30%; -:<5%; ND : Non déterminé; \*: inexistant dans l'espèce. (Torrente et al., 2004)

# **Propriétés**

Après transplantation chez le fœtus de mouton, les cellules souches humaines AC133+ sont capables de reconstituer le compartiment hématopoïétique et de se différencier en cellules endothéliales (Yin et al., 1997). *In vitro*, les cellules souches humaines AC133<sup>+</sup> génèrent des cellules endothéliales et des cellules myéloïdes (Torrente et al., 2004). Lorsque les cellules AC133<sup>+</sup> sont mises en co-culture avec des myoblastes de souris, elles forment des myotubes indiquant leur potentiel myogénique (Torrente et al., 2004).

### Potentiel thérapeutique

Un essai de thérapie cellulaire de phase I a été entrepris en injectant des cellules souches AC133+ autologues chez des patients. L'avantage de ces cellules est qu'elles peuvent être extraites du muscle et/ou du sang et qu'elles sont compatibles avec une administration systémique, au moins chez la souris SCID/mdx. En effet, après injection intra-artérielle, les cellules AC133 participent à la régénération musculaire et reconstituent le compartiment de cellules satellites des muscles dystrophiques. Elles sont capables de générer *in vivo* des fibres musculaires exprimant la dystrophine. Les cellules AC133+ entraînent une amélioration significative de la structure des muscles squelettiques et de leur fonction.

Les cellules AC133<sup>+</sup> semblent être intéressantes dans l'avenir de la thérapie cellulaire des dystrophinopathies. En effet, elles sont relativement faciles à isoler et elles présentent l'avantage d'être utilisable par administration systémique. Les mésoangioblastes et les cellules AC133 sont d'ailleurs les principaux candidats du projet européen MyoAmp, dédié à la mise au point d'un protocole de thérapie cellulaire associé à un saut d'exon dans la DMD. Il s'agit de modifier des cellules souches autologues grâce à un lentivirus par la technique du saut d'exon puis de greffer ces cellules dans le muscle de patients DMD pour qu'elles se différencient en cellules musculaires et le régénère.

L'utilisation de cellules souches, capables de se différencier en différents types cellulaires a donc été envisagée dans la thérapie cellulaire de la DMD. Ces cellules pluripotentes présentent deux avantages par rapport aux myoblastes : elles ont une capacité de survie, de prolifération bien plus élevée et elles sont capables de migrer du système vasculaire jusque dans les tissus.

L'utilisation des cellules souches est prometteuse en termes de persistance de l'expression de la dystrophine et de moyen d'atteindre tous les muscles. Cependant, les différents travaux publiés sur cette thématique suggèrent quelques commentaires :

\_ les éventuelles sous-populations de cellules souches adultes sont mal identifiées, alors que des essais cliniques de phases I et II sont programmés et/ou en cours. Il est impossible aujourd'hui d'attribuer une fonction biologique précise à une des sous-populations de cellules mésenchymateuses;

\_ les cellules multipotentes décrites dans la littérature ont été identifiées dans des conditions in vitro qui restent artificielles et la mise en cycle et l'expansion ex vivo de ces cellules pourraient modifier certaines de leurs propriétés.

Aussi, l'amplification de cellules souches humaines à potentiel myogénique en conditions cliniques pour une utilisation en thérapie cellulaire autologue, et la production en particulier de protocoles d'amplification standardisés, fiables et sécurisés, restent des objectifs majeurs.

# **Conclusions**

Au cours des deux dernières décennies, les cellules satellites, reconnues comme les principales intervenantes dans la croissance post-natale et la régénération musculaire, sont apparues comme capables de présenter des propriétés biologiques et biochimiques diverses. L'étude de l'hétérogénéité de cette population amena à la découverte de cellules souches pouvant présenter un potentiel myogénique *in vitro*. Ces cellules souches peuvent être localisées dans le muscle (MDSC, mSP), ou en dehors (CSM, CSH, cellules souches circulantes). Ces différents types de cellules souches sont caractérisés par une technique d'isolement particulière (MDSC, mésoangioblastes) ou par l'expression de marqueurs spécifiques (cellules SP, cellules souches circulantes).

Il est parfaitement démontré par des expériences de transplantation cellulaire, que les cellules souches citées précédemment peuvent intervenir dans la régénération musculaire à différents niveaux. Un schéma synthétique établi par Collins (2006) résumant l'intervention des cellules satellites et de ces cellules souches dans la régénération musculaire est présenté en Figure 21. Les cellules souches sont décrites comme pouvant participer à la formation de cellules satellites quiescentes, donner par division asymétrique des précurseurs myogéniques, des myoblastes engagés dans la voie de différenciation ou encore de fusionner avec les fibres existantes.

En raison des échecs obtenus à l'issue des essais de transplantation de myoblastes, les méthodes d'isolement de différents types de cellules souches ont pris une très forte importance dans la bibliographie actuelle. Cependant, il existe une grande variabilité phénotypique et comportementale entre ces cellules. De plus, les nombreuses techniques d'isolement ne sont pas standardisées et pour les mésoangioblastes par exemple leurs protocoles d'obtention sont très peu explicités. Enfin, des cellules comme les MDSC ne sont purifiées que tardivement et ceci après la mise en culture des cellules. Hors il est clairement démontré dans la bibliographie que la culture modifie le phénotype des cellules et altère leurs potentialités myogéniques. Ainsi, des efforts doivent être fournis dans les années à venir afin d'obtenir des techniques d'isolement, d'amplification et de conditionnement standardisées qui permettront d'utiliser plus facilement ces cellules pour la thérapie cellulaire.

Le travail de thèse, présenté dans l'étude expérimentale de ce manuscrit, s'inscrit dans la dynamique actuelle, et reposent sur le principe d'une sélection de cellules sur la base de leurs capacités d'adhérence présentant des propriétés biologiques importantes dans le cadre d'une utilisation ultérieure en thérapie cellulaire.

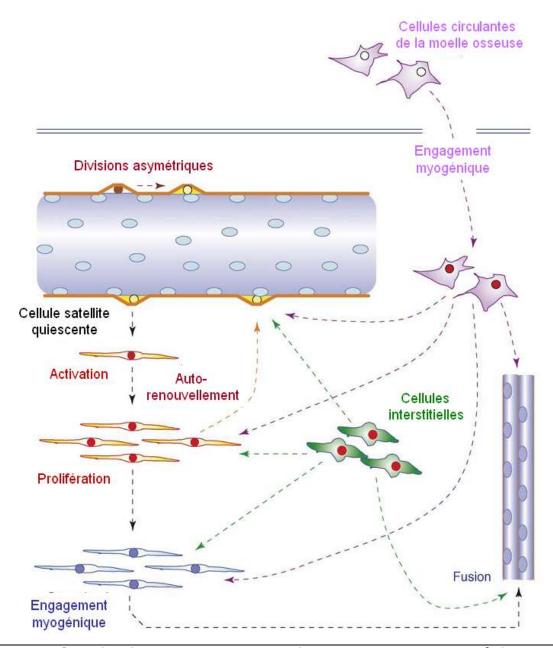


Figure 21 : Contribution des cellules satellites et de cellules myogéniques diverses à la myogénese

Les cellules satellites génèrent des myoblastes capables de proliférer et de se différencier en myotubes pour contribuer à la régénération musculaire. L'autorenouvellement des cellules satellites résulte soit de divisions asymétriques de cellules primitives (Théorie de Kuang et al., 2007), soit de cellules déjà engagées dans la lignée myogénique (Théorie de Zammit et al., 2004). D'autres cellules, notamment des cellules souches adultes, provenant du sang périphérique ou de l'interstitium peuvent contribuer à la myogénèse. (Collins, 2006)

# **Etude expérimentale**

Première partie Analyse de la capacité d'adhérence des MDC : Validation d'un paramètre biologique pour l'isolement de progéniteurs cellulaires

Deuxième partie Evaluation de l'efficacité en transplantation musculaire de MDSC dans le modèle canin de la DMD

Discussion générale

# I. Analyse de la capacité d'adhérence des MDC : Validation d'un paramètre biologique pour l'isolement de progéniteurs cellulaires

# I.1. Position du problème

La découverte ces dernières années de cellules souches en particulier au sein du tissu musculaire adulte est venue renforcer la notion de diversité des MDC et s'est accompagnée de la mise en place d'un nouveau concept pour les acteurs cellulaires de la myogenèse. Celui-ci repose sur l'idée d'une hiérarchie allant de la cellule souche au précurseur en passant par un progéniteur myogénique. Sur cette base conceptuelle, la nécessité de tri des cellules extraites du muscle est devenue évidente et même impérative, dans une perspective d'obtenir une population cellulaire spécifique qui présenterait des potentialités pour la thérapie cellulaire. C'est précisément dans ce contexte que la première partie de mon travail de thèse s'est inscrite.

Suite aux différents travaux de thérapie cellulaire menés chez la souris mdx, utilisant les MDSC obtenues à l'aide de la technique de *preplating*, (Jankowski and Huard, 2004; Lee et al., 2000; Qu-Petersen et al., 2002; Qu et al., 1998; Torrente et al., 2001), nous avons décidé d'explorer l'adhérence des MDC dans un modèle aviaire. Les MDSC ont été décrites par un seul groupe, dans une seule espèce et avec une description méthodologique peu détaillée d'un protocole particulièrement long. L'intérêt potentiel d'une telle approche est qu'elle repose sur un critère purement fonctionnel. Elle permet de s'affranchir de l'utilisation de marqueurs qui ne sont pas toujours disponibles dans des modèles autres que le modèle murin. Elle est donc transposable à tout modèle animal.

Il s'agissait de démontrer l'existence de cellules à adhérence retardée dans un autre modèle que le modèle murin et de s'assurer que cette propriété corresponde bien à une caractéristique intrinsèque de ces cellules. En nous intéressant aux modalités d'isolement des MDSC, nous avons vérifié que ces cellules pouvaient être générées par le protocole expérimental.

# I.2. Matériel et méthodes

# I.2.1. Animaux

Les animaux utilisés sont des dindes de sexe mâle, de la souche commerciale BUT-T9 (Société GRELIER, 49). Les poussins de 1 jour sont élevés dans l'animalerie volaille de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes. Ils sont placées sur litière de paille et sous lampe infrarouge. Ils reçoivent de l'aliment croissance volaille.

# I.2.2. Matériel musculaire

Les muscles sont prélevés sur des poussins de 7-8 jours, qui sont décapités, lavés sous l'eau courante et baignés dans l'éthanol à 70° pendant 10 minutes. Après dégagement de la peau, le muscle pectoral superficiel (Pectoralis superficialis, homogène de type IIB) est prélevé à l'aide d'instruments stériles et sous bec bunsen. Les prélèvements sont placés dans une solution de PBS (Phosphate Buffered Saline, Chambrex Bioscience) contenant 2% d'un mélange d'antibiotiques et d'antifongiques (PSF, Sigma) : pénicilline (100 UI/mL) -streptomycine (0,1 mg/mL) et amphotéricine B (FungizoneND ; 0,25 μg/mL).

# I.2.3. Extraction de MDC

Toutes les manipulations sont réalisées dans des conditions d'asepsie (hotte à flux laminaire). Les cellules sont extraites par une technique enzymatique et mécanique.

Dilacération et rinçages : Les muscles sont dilacérés au scalpel. Le broyât est rincé trois fois dans une solution de PBS contenant 2% de PSF (PBS-2%PSF) puis agité 20 minutes. Une série de trois centrifugations de 5 minutes à 100 G est ensuite effectuée. A chaque centrifugation, le surnageant est retiré et le culot est remis en suspension dans du PBS-2% PSF.

Digestion enzymatique : La phase de digestion est réalisée à l'aide d'une solution enzymatique de protéase (Sigma). La durée de la digestion est d'une heure et demie au bain-marie à 37°C. La

digestion est terminée par une centrifugation de 5 minutes à 150 G. Le surnageant est récupéré et additionné à du milieu M199 (VWR International) contenant 1% de PSF (M199-1%PSF).

Purification: Trois centrifugations de 20 minutes à 300 G sont réalisées. Suite aux deux premières, le surnageant est retiré et le culot cellulaire est remis en suspension avec du M199-1% PSF. A l'issue de la dernière centrifugation, le culot est placé dans du milieu d'extraction (78% M199; 20% Sérum de veau fœtal (SVF, Sigma); 1% PSF; 1% L-Glutamine (VWR International)).

Comptage de la suspension cellulaire : La concentration de la suspension cellulaire est déterminée par dénombrement des cellules vivantes à la cellule de Malassez après coloration au bleu trypan (0,4%).

Dilution : La suspension cellulaire est diluée dans du milieu d'extraction afin d'obtenir la concentration adéquate pour l'ensemencement.

# I.2.4. Séparation des MDC sur la base de leur vitesse d'adhérence :

# Technique d'ensemencements successifs : « preplating »

Les cellules fraîchement extraites du tissu musculaire sont ensemencées à haute densité (100 000 à 150 000 cellules/cm²) en boîtes de culture préalablement gélatinées (0,01%, Sigma). Les boîtes sont placées dans un incubateur à 37°C et à 5% de CO2 pendant une heure (Fig.22A). Le surnageant contenant les cellules non adhérentes est alors prélevé et trois rinçages des boites de culture avec du M199 - 1% PSF sont réalisés, tandis que les cellules adhérentes hautement enrichies en fibroblastes sont éliminées.

Après centrifugation (10 minutes, 1250 rpm), le culot est repris avec du milieu de prolifération (39% DMEM, 39% M199, 20% SVF, 1% L-glutamine et 1% PSF) et un dénombrement des cellules vivantes est effectué à la cellule de Malassez après coloration au bleu trypan (0,1%). Les cellules sont ensemencées sur de nouveaux supports gélatinés en respectant une densité de 100 000 cellules/cm².

Après 24 heures, les cellules non adhérentes sont collectées, centrifugées et placées sur de nouveaux supports comme précédemment décrit.

En parallèle, les cellules ayant adhéré, nommées AC1 (pour Adherent Cells 1) sont détachées par l'utilisation de trypsine (0,05% trypsine/0,02% EDTA (w/v), Sigma), centrifugées, reprises avec

du milieu de prolifération, dénombrées et finalement ensemencées à 10 000 cellules vivantes/cm2 sur de nouveaux supports gélatinés.

Cette procédure est répétée à chaque intervalle de 24 heures et ce, sur 3 jours consécutifs, afin d'obtenir 4 populations distinctes de cellules adhérentes. Les différentes cultures sont entretenues en milieu de prolifération.

Les cellules obtenues à l'issue des différentes étapes de la technique ont ensuite été analysées sur la base de leur comportement in vitro, de leur phénotype et enfin de leur taille.

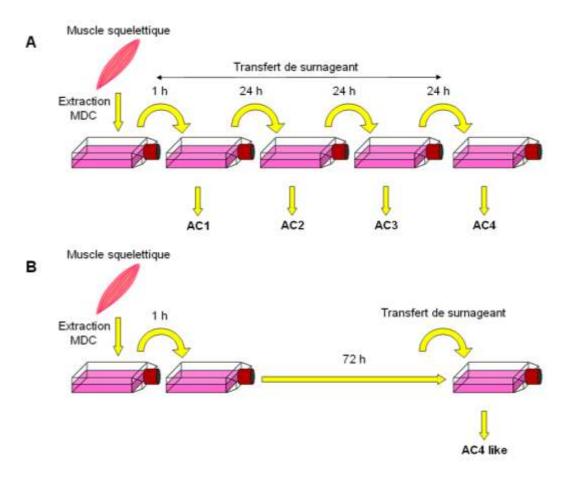


Figure 22 : Séparation des MDC par technique d'ensemencements successifs : technique du « *preplating* »

A. Technique initiale : A l'issue de l'extraction, les MDC sont mises en culture pendant une heure de façon à éliminer la contamination fibroblastique. Le surnageant est retiré à intervalles réguliers de façon à transvaser les cellules non adhérentes dans de nouvelles boîtes de culture. Cette procédure est répétée à chaque intervalle de 24 heures. Les cellules ayant adhéré lors de chaque étape, nommées AC (pour *Adherent Cells*), sont placées dans du milieu de prolifération.

B. Technique modifiée : Après élimination des fibroblastes, les MDC sont mises en culture pendant 72 heures (temps équivalent à l'obtention des AC4) sans manipulation de surnageant. Après ces 72 heures, les cellules non adhérentes sont collectées, centrifugées et placées sur de nouveaux supports. Ces cellules, appelées les AC4-like, sont maintenues dans du milieu de prolifération.

# I.2.5. Evaluation méthodologique de la technique de « preplating »

Compte tenu de la multiplication des étapes de la technique d'isolement et de sa durée, nous avons entrepris une évaluation méthodologique de notre protocole.

Dans un premier temps, nous avons vérifié que la procédure expérimentale n'était pas génératrice des cellules d'intérêt. En effet, les LAC pourraient être des cellules ayant adhéré rapidement au support mais qui se détacheraient au cours des manipulations ou des rinçages. Pour cela, nous avons modifié la technique initiale. Après élimination des fibroblastes, les MDC sont ensemencées en boîtes de culture préalablement gélatinées. Les boîtes sont placées dans un incubateur à 37°C et à 5% de CO<sub>2</sub> pendant 72 heures (temps équivalent à l'obtention des LAC) sans manipulation de surnageant (Fig.22B). Après ces 72 heures, les cellules non adhérentes sont collectées, centrifugées et placées sur de nouveaux supports. Ces cellules, appelées les AC4-like, sont maintenues dans du milieu de prolifération pendant 3 jours, temps nécessaire à ce qu'elles adhérent au support. Puis, le milieu de prolifération est renouvelé tous les deux jours.

Dans un second temps, nous avons émis l'hypothèse que les AC4 étaient des cellules générées par les AC1. Nous avons alors mis en place un protocole expérimental utilisant les cultures de AC1 obtenues par la technique modifiée. Après les 72 heures pendant lesquelles les MDC sont placées en culture sans manipulation de surnageant, le transfert du surnageant est effectué afin d'isoler les AC4-like. Les cellules ayant adhéré, les AC1, sont alors divisées en deux parties et subissent des traitements différents (Fig.23) :

- dans certaines flasques contenant AC1, le milieu de prolifération est renouvelé. Les boîtes sont placées dans un incubateur à 37°C et à 5% de CO<sub>2</sub> pendant 72 heures sans manipulation de surnageant. Après ces 72 heures, les surnageants sont collectées et centrifugées. Nous avons alors recherché la présence de cellules non adhérentes dans ces surnageants. Le milieu de prolifération des cultures de AC1 est renouvelé et une procédure identique est répétée 72 heures plus tard.
- dans les autres flasques contenant AC1, les cellules sont détachées par l'utilisation de trypsine, centrifugées, reprises avec du milieu de prolifération, dénombrées et finalement ensemencées à 10 000 cellules vivantes/cm² sur de nouveaux supports gélatinés. 72 heures plus tard, les surnageants sont collectées et centrifugées et le nombre de cellules non adhérentes dans ces surnageants est déterminé. Les AC1 sont à nouveau détachées et réensemencées. Une procédure identique est répétée 72 heures plus tard.

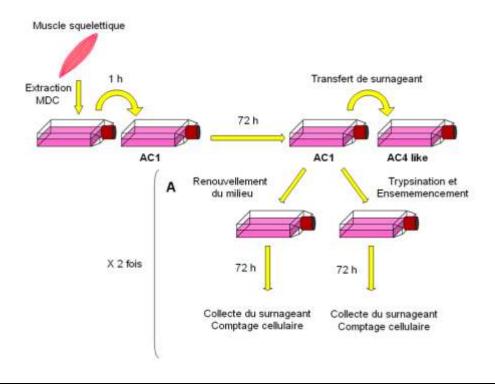


Figure 23 : Evaluation méthodologique de la technique de « preplating »

Après élimination des fibroblastes, les MDC sont mises en culture pendant 72 heures sans manipulation de surnageant. Après ces 72 heures, les cellules non adhérentes sont collectées, centrifugées et placées sur de nouveaux supports de façon à isoler les cellules AC4-like. Les cultures de AC1 sont alors divisées en deux parties :

A. Le milieu de prolifération est renouvelé pour une partie des cultures. Celles-ci sont maintenues à 37°C pendant 72 heures. A ce moment, le surnageant de ces cultures est collecté et le nombre de cellules n'ayant pas adhéré est déterminé.

B. Les AC1 restantes sont trypsinées et réensemencées sur de nouveaux supports gélatinés. 72 heures plus tard, le surnageant de ces cultures est collecté et le nombre de cellules n'ayant pas adhéré est déterminé. Les procédures A et B sont répétées deux fois de suite.

# I.2.6. Evaluation de la différenciation myogénique des MDC en cultures primaires

La différenciation des MDC est évaluée sur des critères morphologiques (nombre et taille des myotubes) et sur des critères immuno-histochimiques (apparition des isoformes précoces des chaînes lourdes de myosine). Nous avons utilisé un anticorps (Ac) dirigé contre EB165, l'isoforme embryonnaire. Ils ont été fournis par le Dr. E. Bandman (University of California, Davis, CA). La spécificité de ces Ac est établie chez le poulet (Bandman and Bennett, 1988; Bandman et al., 1990) et chez la dinde (Maruyama and Kanemaki, 1991). La technique immunohistochimique utilisée est adaptée aux cultures cellulaires. Après 8 à 12 jours d'évolution, les cultures, fixées à l'éthanol 70°C, sont traitées avec

une solution de triton diluée à 5 % dans du PBS pendant 1 heure à 37°C en atmosphère humide. L'anticorps primaire est dilué dans du PBS contenant 2% d'Albumine Sérique Bovine (BSA, Sigma) au 1/2500. L'anticorps secondaire (anticorps biotinylé anti Ig de souris, Dako) est dilué dans du PBS contenant 2% de BSA au 1/300ème et mis à incuber pendant 30 minutes. Le complexe anticorps I / anticorps II est révélé par ajout de streptavidine / peroxydase (Dako) diluée au 1/300 dans du PBS pur pendant 30 minutes, puis d'acide Di-Amino Benzoïque (D.A.B., Dako) pendant 15 minutes. Toutes les incubations sont réalisées à température ambiante.

Une culture de fibroblastes de dinde est utilisée en parallèle comme témoin négatif pour valider la technique d'immunomarquage.

# I.2.7. Evaluation de la prolifération des MDC en culture clonale

L'étude des capacités de prolifération des MDC est réalisée en culture clonale. L'ensemencement en plaques de 96 puits préalablement gélatinées est réalisé par la méthode de dilution limite. 24 heures après l'ensemencement, 100 µL de milieu de prolifération sont ajoutés par puits. Le milieu est ensuite renouvelé toutes les 48 heures.

Le repérage des clones est effectué au bout de 5 jours et une sélection stricte est réalisée entre 5 et 11 jours. Les clones dont l'origine monocellulaire est douteuse sont éliminés. Au bout de 11 jours de culture, le comptage des cellules de chaque clone retenu est effectué.

# I.2.8. Evaluation du niveau de différenciation myogénique des MDC par immunocytochimie

Le phénotype des MDC est obtenu par immunocytochimie réalisée sur les lames polysine TM.

Un volume de suspension correspondant à 2.10<sup>6</sup> cellules est prélevé, centrifugé à 1500 rpm (10 minutes) et repris dans 550µl de PBS. 10 µl de cette suspension, soit environ 40 000 cellules, sont déposés sur une lame. Les lames sont séchées en étuve à 37°C (30 minutes), puis conservées à -20°C.

Les lames sont traitées au Triton X-100 à 0,5% pendant 30 minutes, afin de perméabiliser les membranes, puis incubées pendant 20 minutes avec une solution de blocage (2% de sérum de

chèvre, 5% de sérum de chien et 2% de sérum albumine bovine, dilués dans du PBS), de façon à saturer les sites de fixation non spécifiques avant l'incubation avec l'anticorps (Ac) primaire (1 heure, 37°C). Quatre Ac ont été testés : un Ac polyclonal de lapin dirigé contre la M-cadhérine humaine (dilution, 1:50; Santa Cruz Biotechnology), un Ac monoclonal (mAc) de souris spécifique de la desmine humaine (dilution, 1:50; Dako), un mAc de souris spécifique du facteur de transcription Pax7 du poulet (dilution, 1:10; Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), Iowa City, Iowa), et un mAc murin, QH1, dirigé contre des antigènes (Ag) de cellules endothéliales et hématopoïétiques de caille (dilution, 1:40; DSHB). Après une série de trois rinçage en PBS, les lames sont mises à incuber avec l'Ac secondaire (1 heure, température ambiante). L'Alexa 488 antilapin (dilution, 1:200; Molecular Probes), l'Alexa 488 anti-souris (dilution, 1:200; Molecular Probes) et un Ac secondaire anti-souris couplé au fluorochrome TRITC (TetRamethylrhodamine-5-IsoThioCyanate; 1:40; Dako, Glostrup, Danemark), sont utilisés pour le marquage de la M-cadhérine, de Pax7 et de QH1, respectivement. Après trois rinçages dans du PBS, les lames sont montées avec du milieu de montage contenant le colorant nucléaire DAPI (4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole; Vector Laboratories) et examinées avec un microscope à fluorescence.

La proportion de cellules marquées par les différents Ac est déterminée à l'aide du logiciel d'analyse d'images (LUCIA imaging software, Laboratory Imaging Inc.).

# I.2.9. Evaluation morphométrique des MDC

Les MDC sont déposées sur une cellule de Malassez et observées au microscope inversé. Afin de déterminer la distribution de taille de ces cellules, au moins 300 cellules de chaque population (n = 4, expériences indépendantes) ont été mesurées automatiquement grâce au logiciel d'analyse LUCIA. Le diamètre minimal « Feret », défini comme la distance minimale entre les tangentes parallèles des bords de la cellule, a été sélectionné pour exprimer la taille des cellules. Ce paramètre est fréquemment employé pour l'analyse morphométrique (Nguyen et al., 2005).

# I.2.10. Analyse statistique des résultats

Toutes les valeurs mesurées ont été comparées entre les différentes fractions par une analyse de la variance (ANOVA), suivie par un test de Fisher PLSD afin de déterminer les différences

significatives. Avec une valeur de p < 0.05, la différence est considérée comme significative. Cette analyse a été réalisée grâce au logiciel de statistiques Stat View (Brain Power, Calabasas, CA). Les proportions ont été comparées par un test de  $\chi^2$ .

# I.3. Résumé des résultats obtenus

L'ensemble des résultats concernant la sélection de progéniteurs myogéniques sur le critère adhérence cellulaire a fait l'objet da l'article composant le corps de cette partie. Nous ne présenterons donc, dans ce résumé, qu'une synthèse des points importants.

# I.3.1. L'adhérence : un critère de tri des MDC

En utilisant la technique du preplating, nous avons montré que les MDC présentent de grandes variations dans leurs capacités d'adhérence, nous permettant ainsi d'isoler une fraction cellulaire marginale présentant un défaut d'adhérence initial et correspondant à environ 1% de la population de MDC. Pour la première fois, il a été montré que le défaut initial d'adhérence n'est pas modifié *in vitro* par la présence de cellules myogéniques (principalement des myoblastes) et par conséquent qu'il correspond à une caractéristique biologique intrinsèque majeure pour ces cellules.

De plus, il a été établi à la suite des investigations méthodologiques que les cellules à adhérence tardive (LAC) ne sont pas générées *in vitro* par les cellules à adhérence précoce (EAC) et qu'elles correspondent de fait bien à une population marginale résidente du tissu musculaire squelettique.

# 1.3.2. Les LAC : Une population de cellules myogéniques immatures

Par des analyses phénotypiques, nous avons révélé que les LAC contiennent des cellules myogéniques à un stade précoce de la différenciation musculaire, ou des progéniteurs immatures. En effet, les LAC sont riches en cellules exprimant des marqueurs myogéniques précoces (M-cadhérine: 62,7±4,8%; Pax7: 50,0±3,7%), contrairement aux EAC qui contiennent les précurseurs myogéniques déterminées qui expriment la desmine, un marqueur myogénique tardif (41,8±2,9%).

*In vitro*, les LAC présentent toutes les caractéristiques morphologiques et comportementales de cellules immatures, avec une petite taille, une faible capacité de prolifération en culture clonale et une différenciation tardive. Les LAC se caractérisent par un état de quiescence maintenu pendant 7 jours suivi d'une prolifération initiale sous forme de colonies microsphéroïdes ou « myosphères ».

Collectivement, ces résultats démontrent que l'adhérence tardive d'une fraction marginale des MDC est une caractéristique biologique retrouvée chez la dinde comme chez la souris et qu'elle peut être utilisée pour isoler à partir des MDC, des fractions cellulaires composées de progéniteurs ou de cellules peu engagées dans la voie de différenciation myogénique.

Ce travail a été présenté sous forme de poster lors du Congrès international Myology 2005 (Nantes) et fait l'objet d'un article publié dans The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: 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, 607-18.

# I.4 Publication

Volume 55(6): 607-618, 2007 Journal of Histochemistry & Cytochemistry http://www.jhc.org

#### ARTICLE

# Progenitor Cell Isolation From Muscle-derived Cells Based on Adhesion Properties

Karl Rouger, Benoît Fornasari, Valerie Armengol, Gregory Jouvion, Isabelle Leroux, Laurence Dubreil, Marie Feron, Laetitia Guevel, and Yan Cherel

INRA, UMR703, Développement et Pathologie du Tissu Musculaire, Ecole Nationale Vétérinaire, Nantes, France (KR,BF,VA,GJ,IL,LD,YC); INSERM, UMR791, Laboratoire d'Ingenierie Ostéo-articulaire et Dentaire, Faculté de Chirurgie Dentaire, Nantes, France (VA); and Biotechnologie, Biocatalyse et Biorégulation (U3B), Faculté des Sciences et des Techniques, CNRS, UMR6204, Nantes, France (MF,LG)

SUMMARY Adult skeletal muscle possesses remarkable regenerative capacity that has conventionally been attributed to the satellite cells. These precursor cells were thought to contain distinct populations with varying myogenic potential. Recently, the identification of multipotent stem cells capable of new myofiber formation has expanded the general view on the muscle regenerative process. Here we examined the characteristics of turkey skeletal muscle-derived cell (MDC) populations that were separated according to their adhesion abilities. We sought to determine whether these abilities could be a potential tool for separating cells with different myogenic commitment. Using the preplate technique, we showed that MDCs display a wide range of adhesion ability, allowing us to isolate a marginal fraction with initial adhesion defect. Methodological investigations revealed that this defect represents an intrinsic and well-established biological feature for these cells. In vitro behavioral and morphological analyses showed that late adherent cells (LACs) share several primitive cell characteristics. Phenotypic assessment indicated that LACs contain early stage myogenic cells and immature progenitors of satellite cells, whereas early adherent cells consist mainly of fully committed precursors. Overall, our findings demonstrate for the first time in an avian model that differential MDC adhesion properties could be used to efficiently purify cells with varying myogenic commitment, including immature progenitor cells. This manuscript contains online supplemental material at http://www.jhc.org. Please visit this article online to view these materials. (J Histochem Cytochem 55:607-618, 2007)

KEY WORDS

myogenesis muscle-derived cell skeletal muscle adhesion preplate technique avian

Skeletal Muscle is an adult postmitotic tissue that retains the ability to regenerate. Classically, it was thought that repair of injured or damaged muscle fibers was attributable only to the population of mononucleated precursor cells, the satellite cells (Snow 1977; Bischoff 1986; Beauchamp et al. 2000; Scale and Rudnicki 2000). Satellite cells are small fusiform cells that reside beneath the basal lamina of adult skeletal muscle, closely juxtaposed to the muscle fibers (Mauro 1961; Schultz and Jaryszak 1985; Bischoff 1986). In this position, they

Correspondence to: Karl Rouger, INRA, UMR703, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Route de Gachet, BP-40706, Nantes, F-44307 France. E-mail: rouger@vet-nantes.fr

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this work. Received for publication July 26, 2006; accepted January 30, 2007 [DOI: 10.1369/jhc.6A6954.2007]. are considered to be mitotically quiescent (Moss and Leblond 1970; Schultz et al. 1978). Upon activation, satellite cells migrate, rapidly undergo extensive proliferation for a few days, differentiate into myoblasts, and finally fuse with existing muscle fibers to add nuclei or with other satellite cells to form nascent myofibers (Campion 1984; Darr and Schultz 1987). The number of quiescent satellite cells in adult muscle is relatively constant (2%-5% of sublaminal nuclei), suggesting a capacity for self-renewal within their compartment (Gibson and Schultz 1983; Schultz and Jaryszak 1985). Both in vitro and in vivo investigations have demonstrated that satellite cells adopt varying behaviors, indicating that they are highly heterogeneous in nature. Differences between satellite cells were then revealed based on their proliferation rate (Schultz and McCormick 1994; McFarland et al. 1995a; Rantanen et al. 1995;

The Histochemical Society, Inc.

0022-1554/07/\$3.30

607

Molnar et al. 1996; Lagord et al. 1998) and on their fusion ability (Baroffio et al. 1996), as well as on their ability to migrate and/or respond to growth factors (Cossu and Molinaro 1987; McFarland et al. 1993, 1995b). Using autologous cell transplantation, our group reported in vivo that avian satellite cells with different in vitro proliferation rates intrinsically differ in their potential to fuse with muscle fibers (Rouger et al. 2004).

Several studies have reported evidence that populations of adult stem cells may be isolated from muscle tissue or other tissues and still achieve muscle regeneration (Ferrari et al. 1998; De Angelis et al. 1999; Gussoni et al. 1999; Jackson et al. 1999; Galli et al. 2000; Young et al. 2001a,b; Jiang et al. 2002). Muscleand bone marrow-resident side population (SP) cells, defined by their ability to exclude the fluorescent dye Hoechst 33342, have been shown to actively participate in the formation of skeletal muscle fibers during regeneration in the mdx mouse (Gussoni et al. 1999; Jackson et al. 1999). In Pax7 / mice, which exhibited a complete absence of satellite cells but exhibited the presence of normal SP cells, it has been shown that SP cells are distinct from satellite cells (Seale and Rudnicki 2000). Additionally, bone marrow SP cells have been reported to participate in myogenesis when injected IV into injured mouse muscle (Ferrari et al. 1998) or mdx mouse muscle (Bittner et al. 1999). Finally, other studies have indicated that progenitor cells isolated from the neuronal compartment (Galli et al. 2000), the embryonic vasculature (De Angelis et al. 1999), and various mesenchymal tissues (Young et al. 2001a,b; Jiang et al. 2002) can also differentiate into myogenic lineage. A technique consisting of serial platings of musclederived cells (MDCs) has demonstrated that mice MDCs can be separated according to their adhesion properties (Qu et al. 1998; Torrente et al. 2001; Jankowski et al. 2002b; Qu-Petersen et al. 2002). This technique, named prelate technique, was originally developed to preferentially select myogenic cells and eliminate other nonmyogenic tissue from the culture on the basis of the cell type having differing propensities to adhere to collagen-coated culture flasks (Richler and Yaffe 1970). Recently, it has been presented as an effective tool for isolating delayed adhesion cells able to significantly improve both cell survival after IM injection (Qu et al. 1998) and efficiency of regeneration of mdx muscles (Qu-Petersen et al. 2002). Together these results suggest that preliminary selection of cell fractions could have considerable impact on the effectiveness of new muscle fiber formation.

Given this background, we separated MDCs based on their adhesion criteria in the avian model and explored the properties of the sorted subpopulations. With a slight adaptation of the preplate technique, we showed that the MDCs extracted from turkey *Pectoralis* 

major muscle displayed a wide, continuous range of adhesion ability. For the first time, we demonstrated that the initial adhesion defect exhibited by the late adherent cells (LACs) was not related to the experimental procedure or was not eliminated by the presence of muscle cells that were proliferating or differentiating. Additionally, we determined that LACs could not be generated from the earliest adherent cell (EAC)-derived primary cultures. In vitro, LACs displayed an initial mitotically quiescent status followed by atypical proliferation modalities and a specific ability to differentiate. Using morphometrical analysis, we found that LACs contained large numbers of small, round cells. We established, with myogenic stage markers, that LACs were composed of cells at an early stage toward the myogenic differentiation process and immature progenitor cells, whereas EACs were fully committed precursors. Overall, our data show that the initial adhesion defect of a marginal MDC fraction is a shared biological parameter between mouse and turkey, and that the cell adhesion function could be used to enrich myogenic cell fractions with immature progenitor cells.

#### Materials and Methods

#### Animals

Male turkeys (Meleagris gallopavo) were produced from a medium-heavy commercial BUT-T9 strain (British United Turkey Limited; Warren Hall, Broughton, Chester, UK). Animals were kept in a conventional animal facility of the National Veterinary School of Nantes, according to animal care guidelines. The French National Institute for Agricultural Research guide for the care and use of laboratory animals was followed.

#### MDC Isolation

MDCs were isolated from Pectoralis major muscle of at least 20 7-day-old turkeys, as previously described (McFarland et al. 1988; Rouger et al. 2004). In brief, muscles were removed under sterile conditions, cut into 1-2 cm2 sections, and digested for 1 hr at 37C with 0.12% Pronase E (Sigma; St Louis, MO) dissolved in 199 medium (M199; VWR, Strasbourg, France) in a shaking water bath. The mixture was centrifuged at 150 × g for 5 min and the supernatant discarded. The pellet was washed with PBS and submitted to successive centrifugation (300 × g, 20 min) and sequential filtering through 100-, 70-, and 40-µm pore-diameter nylon mesh (BD Biosciences; San Jose, CA) to allow separation of the MDCs from the muscle debris. Cells were resuspended in a proliferation medium (88% M199, 10% fetal calf serum; Sigma), 1% penicillin streptomycin fungizon (PSF; Sigma), and 1% L-Glutamin (Sigma). Cell viability was assessed using trypan blue staining, and in all cell isolations it was >85%.

#### MDC Fractioning Based on Adhesion

The muscle cell suspension was plated on the culture flasks using a modified version of the technique described by Qu et al. (1998). A flow chart is presented in Figure 1A. Freshly extracted MDCs were plated on 0.1% gelatin-coated flasks (Sigma) for 1 hr. Floating cells found in the supernatant were then centrifuged, counted, and transferred to other gelatincoated flasks, and adherent cells (ACs) were discarded. ACs, which rapidly adhered, were highly enriched in fibroblast cells as previously described (Rando and Blau 1994; Qu et al. 1998). After 24 hr, floating cells were collected, centrifuged, and plated on new flasks with a proliferation medium. In parallel, the ACs (named AC1) were trypsinized (0.1% trypsin/EDTA; Sigma), centrifuged, resuspended in proliferation medium, and tested for their viability using trypan blue exclusion test. Finally, they were plated at 10,000 viable cells/cm2 on fresh gelatin-coated wells. This procedure was repeated at 24-hr intervals for AC2 and AC3 isolation. It took the last floating cells, obtained after 72 hr of experimental procedure, an additional 3 days without medium change to attach to gelatin-coated flasks. These cells were named AC4. This process resulted in four cultures of ACs plated at the same density. Cultures were routinely grown at 37C in a 5% CO2 atmosphere. Medium was replaced every 2 days. This experiment was independently repeated five times.

#### Methodological Investigations of the Preplate Technique

To ensure that AC4 has not been artificially selected by the experimental procedure (cell detachment during rinses), MDCs obtained after initial plating of 1 hr (e.g., depleted from most fibroblastic cells) were plated in primary cultures and maintained at 37C for 72 hr (e.g., equivalent time to isolate AC4 in original protocol) without any manipulation. After that, floating cells in supernatants were centrifuged, counted, and plated on new flasks with a proliferation medium. These cells were maintained for 3 days without medium removal to allow their adhesion. Cells were named AC4-like (Figure 1B). Cultures were routinely grown at 37C in a 5%

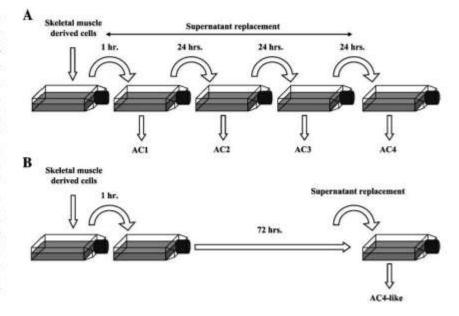
CO<sub>2</sub> atmosphere. Medium was replaced every 2 days. This experiment was independently repeated four times.

Furthermore, to determine whether AC4 could be generated by the EACs or were derived only from the tissue at the time the primary culture was established, MDCs depleted from most fibroblastic cells were submitted to the modified protocol allowing AC4-like isolation, as presented above. After the supernatant removal at 72 hr, floating cells were treated as described above, whereas the flasks containing ACs were divided into two parts; (i) one-half received a new proliferation medium and were maintained at 37C for 72 hr without any manipulation (Figure 2A); (ii) cells from the second half were trypsinized, centrifuged, and resuspended in proliferation medium. They were then plated at 10,000 viable cells/cm2 on fresh gelatin-coated cultureware and also maintained for 72 hr without any manipulation (Figure 2B). In both conditions, supernatants were collected, centrifuged, and residual population of floating cells was counted. Medium change or trypsinization was done a second time. The experiment was independently repeated two times.

#### MDC Differentiation

The capacity for muscle differentiation of cells from each preplate step was studied daily in primary culture based on cells' morphology and expression profile for the embryonic/adult fast myosin heavy chain (MHC). Embryonic/adult fast MHC was detected using EB165 monoclonal antibody (MAb), which reacts with all embryonic MHC isoforms and adult fast MHC (Cerny and Bandman 1987; Bandman and Bennett 1988). EB165 MAb was a kind gift from Everett Bandman (University of California; Davis, CA). This MAb that is specific for chicken MHC also reacts with turkey myosin isoform (Maruyama and Kanemaki 1991). Cells were fixed in 4% cold paraformaldehyde (PFA) in 0.1 mol/liter phosphate buffer and treated with 0.5% Triton X-100/20% (w/v) goat serum in PBS, prior to incubation for 1 hr with

Figure 1 Muscle-derived cell (MDC) subpopulation isolation using differential adhesion properties. (A) After their extraction from Pectoralis major muscle of 7-day-old turkeys, MDCs underwent successive plating using an adaptation of the preplating technique previously described (Qu et al. 1998). After 1 hr, floating cells were transferred to fresh culture flasks, and adherent cells (ACs), mainly fibroblasts, were discarded. After 24 hr, floating cells present in the second flasks were collected and plated on new flasks. The subsequent preplates were performed daily, resulting in four cultures of ACs. (B) MDCs were depleted on fibroblastic cells, seeded, and maintained at 37C for 72 hr without any manipulation. Floating cells found in the supernatant were then transferred to fresh culture flasks and maintained for 3 days without medium removal to allow their adhesion. Cells that were adherent after 6 days were named AC4-like.



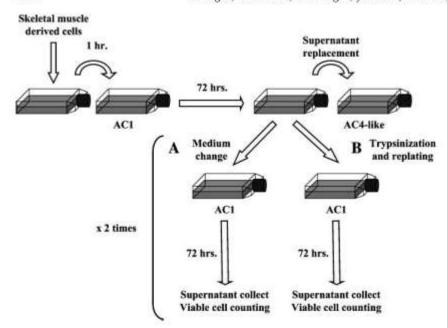


Figure 2 Investigation of the late adherent cell (LAC) origin. After major depletion on fibroblastic cells, MDCs were maintained at 37C for 72 hr without any manipulation. At that time, floating cells collected in the supernatant were seeded on new culture flasks and maintained for 3 days without medium removal, to allow their adhesion. In parallel, flasks containing ACs were divided into two parts and submitted to different procedures. (A) One half received fresh proliferation medium and were maintained at 37C for 72 hr without any manipulation. After that, supernatants were collected and viable floating cells were searched. (B) Cells from the second half were trypsinized and replated at 10,000 viable cells/cm2 on fresh gelatin-coated cultureware. After 72 hr without manipulation, supernatants were collected, and viable floating cells were counted. Medium change or trypsinization was done a second time.

mouse MAb to MHC (1:2500). Cells were washed in excess PBS and then incubated successively with the biotinylated goat anti-mouse Ig for 30 min (1:300; Dako, Glostrup, Denmark) and the streptavidin-horseradish peroxidase for 30 min (Dako) with washing between incubation with three changes of PBS. Peroxidase activity was revealed using the chromogen DAB (Dako) as substrate with a reaction time of 10 min. Control staining was performed in an identical fashion with omission of the primary antibody. Syncytia with at least three nuclei were considered to be myotubes.

#### MDC Proliferation

Clonal cell cultures from each AC fraction were used, Clonally derived colonies were obtained by limiting dilution to a concentration of one cell per well in gelatin-coated 96-multiwell dishes (BD Biosciences). Medium was changed every 2 days. To select the clonally derived colonies of myogenic nature from those developed from fibroblastic cell, all cultures were fixed in 4% cold PFA at day 11 and initially tested for their expression of desmin, a myogenic lineage-restricted intermediate filament protein (Carlsson and Thornell 2001). Desmin was detected with mouse MAb (1:50; Dako), in the same way as described above. A control of the antibody reactivity with turkey equivalent protein has been done using a 1:50 dilution (See online Supplementary Materials, Figures SF1 and SF2). Proliferation was then evaluated in AC-derived myogenic colonies. The cell number per well was not high enough to allow a [3H] thymidine incorporation procedure. Therefore, the proliferation rate of each AC type was evaluated by counting the number of nuclei in each myogenic clonally derived colony previously stained with Giemsa.

#### Morphometric Analysis of MDCs

The image analysis system consisted of a digital camera (DXM1200; Nikon, Champigny Sur Marne, France), a microscope (DMIRB; Leica, Gennevilliers, France), a digitizer tablet with an optic pencil (Wacom; Stagnum, France), and a software program system for image processing and analysis (LUCIA G 4.51; Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic). Cells were detached from the gelatin-coated flasks, and at least five microscopic fields were randomly selected to explore > 300 cells from each AC fraction (n>4, independent experiments). Captured images were submitted to LUCIA G (Laboratory Imaging) image analysis system that allowed automatic measure of the cell size. The minimal 'Feret's diameter', defined as the minimum distance between parallel tangents at opposing borders of the muscle cell, was selected to express cell size. This geometrical parameter was frequently used for morphometrical analysis (Dolapchieva et al. 2000; Briguet et al. 2004; Nguyen et al. 2005) and allows for reliable measure of cell cross-sectional size.

#### Evaluation of the Myogenic Commitment of MDCs

Each AC fraction was evaluated for QH1 expression to determine the possible contamination by endothelial and hematopoietic cells. Indeed, QH1 is a MAb that essentially recognizes these two cell types (Pardanaud et al. 1987). M-cadherin, Pax7, and desmin expression were determined to gauge the respective progression of cells toward end-stage myogenic differentiation. Cells were centrifuged at 470 × g for 5 min and resuspended with PBS to a final concentration of  $4 \times 10^6$ cells/ml; 40,000 cells were deposited on Polysin microscope slides (Menzel-Glaser; Braunscheig, Germany) that were dried at 37C for 30 min and stored at 20C until further processing (cytospin preparation). The following antibodies were used: mouse MAb to quail QH1 (1:40, supernatant; Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA), rabbit polyclonal antibody to human M-cadherin (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), mouse MAb to chicken Pax7 (1:10, supernatant; Developmental Studies Hybridoma Bank), and mouse MAb to human desmin (1:50; Dako). Preliminarily, QH1 MAb reactivity with turkey cells was validated, using positive and negative controls (see online Supplementary Materials, Figures SF3 and SF4). Also, reactivity of the M-cadherin and Pax7 antibody in turkey animal was controlled (see online Supplementary Materials, Figures SF1, SF5 and SF1, SF6, respectively). Specificity of these three antibodies was preliminarily tested using the dilutions indicated above (see online Supplementary Materials). Slides were treated for 30 min with 0.5% Triton X-100 and incubated for 20 min with a blocking solution (2% goat serum, 5% dog serum, and 2% BSA diluted in PBS) prior to primary antibody incubation. Anti-mouse Alexa Fluor-488 secondary antibody and anti-rabbit Alexa Fluor-488 secondary antibody (1:100; Molecular Probes, Eugene, OR) were used. Coverslips were mounted using Vectashield containing DAPI nuclear dye (Vector Laboratories; Burlingame, CA), and slides were viewed using a confocal laser scanning microscope (CLSM; Nikon). For each immunolabeling, >200 cells were considered from each AC fraction (n=4, independent experiments).

#### CLSM

Slides were viewed by CLSM using a TE2000 Nikon inverted microscope equipped with ×20 water-immersion objective. Alexa Fluor-488 was excited using an argon ion laser with a bandpass of 515–530 nm. Propidium iodide was excited at 543 nm using helium-neon laser with a bandpass of 565–605 nm. Each image was recorded separately in two different channels (red and green). Overlaying of the recorded images allowed simultaneous visualization of the immunolabeling and the counterstained nuclei.

#### Statistical Analysis

All reported data were compared among different cell fractions with ANOVA followed by Fisher's protected least significant difference test using statistical software (Stat View, Brain Power; Calabasas, CA). Proportions were checked with the  $\chi^2$  test. Data were reported as mean  $\pm$  SD. A value of p<0.05 was considered statistically significant.

#### Results

#### MDC Distribution Based on Adhesion Ability

Immediately after their extraction, at least  $1 \times 10^8$  MDCs underwent a modified version of the preplating technique. MDC distribution was assessed by determining the proportion of viable cells that adhered to the substrate on each plating (Table 1, five independent experiments). After 24 hr,  $90.5 \pm 4.7\%$  of whole MDCs were adherent to gelatin-coated cultureware and named AC1;  $7.7 \pm 3.6\%$  (AC2) and  $0.8 \pm 0.6\%$  (AC3) of the initial extracted cells were adherent to the gelatin matrix 48 hr and 72 hr later, respectively. Finally,  $1.0 \pm 0.9\%$  (AC4) of all MDCs were adherent after 6 days. MDCs showed variable adhesion ability, enabling us to separate them into four fractions over 6 days; 98.2% of all MDCs were adherent during the first 2 days.

To ensure that the presence of AC4 was not due to a methodological artifact (cell detachment during rinses),

Table 1 Distribution of MDCs based on adhesion abilities

Culture Time	ACs	Percentage of ACs	Completed percentage
1 day	AC1	90.5 + 4.7	90.5
2 days	AC2	7.7 + 3.6	98.2
3 days	AC3	0.8 + 0.6	99.0
6 days	AC4	1.0 + 0.9	100.0
6 days	AC4-like	4.0 + 0.8	-

After extraction, MDCs underwent a modified version of the preplating technique (Qu et al. 1998). ACI, ACZ, and AC3 were defined as cells that were adherent after 24, 48, and 72 hr, respectively. It took residual floating cells an additional 3 days to attach to gelatin-coated flasks. After that, ACs were named AC4. Additionally, freshly extracted MDCs were seeded and maintained at 37C for 72 hr without any manipulation. Floating cells found in the supernatural were then transferred to fresh culture flasks and maintained for 3 days without medium removal to allow their adhesion. Cells adherent after 6 days were named AC4-like. Cell proportions were determined by counting the rismber of cells that were adheernt after each plating. Percentages of each type of AC was expressed with regard to the number of MDCs obtained after initial plating of 1 hr, allowing for depletion on fibroblastic cells. MDCs magicie-derived cells AC adherent cell.

some of the freshly extracted MDCs were seeded in primary culture and maintained at 37C for 72 hr without manipulation, e.g., the time necessary to allow adhesion of AC1 to AC3 in the other protocol. After three additional days, repeated enumeration of ACs revealed that  $4.0 \pm 0.8\%$  of the total initially seeded cells were adherent (four independent experiments). These cells were named AC4-like. The number of AC4-like cells was greater than AC4 cells (p < 0.001). This demonstrates that the delayed adhesion attributed to the AC4 fraction was not inherent to the experimental procedure and was not modified by the presence of proliferating or differentiating muscle cells.

Furthermore, to gain data on the AC4 origin, MDCs were maintained at 37C for 72 hr without manipulation, after which culture supernatants were collected to isolate the AC4-like cells, as described above. Parallel flasks containing ACs received new proliferation medium, or cells from other flasks were trypsinized and re-seeded on fresh gelatin-coated flasks. In both procedures, culture supernatants were collected after 72 hr without manipulation, and viable cells were counted and transferred to gelatin-coated flasks. This was repeated two times. Although AC4-like cells were enumerated at day 6, any viable cell was found in supernatants collected from both experimental procedures (two independent experiments). This revealed that AC4 derived only from the tissue at the time the primary culture was established and clearly were not generated by the early AC-derived cultures. Moreover, this enabled us to precise that the AC4 isolation after several days in vitro could not be assimilated to a cell culture artifact, as it could not be reproduced from two independent cell culture contexts.

#### In Vitro Evolution of MDCs

To investigate whether the differential adhesion criteria demonstrated with the preplating technique could be associated with varying proliferation and differentiation abilities, cells from each preplating step, as well as AC4-like cells, were analyzed in primary culture.

Within 1-2 days, many AC1 cells were fusiform and began to develop cytoplasmic extensions. After 4-5 days, cultures displayed a 50%-60% confluence and were composed of numerous multinucleated myotubes identifiable by their tubular form. Three days later, the cell number had increased and some large, stellate myotubes with numerous additional nuclei were observed (Figure 3A). At day 12, the myotubes were strongly positive for embryonic MHC (Figure 3D). AC2- and AC3-derived cultures displayed the same time course of proliferation, as well as the formation of identical myotubes. Surprisingly, AC4 cells were round and refringent within the first days of culture. After 4 days, they were still mononucleated without morphological change, similar to cells in quiescent state (Figure 4A). They then began to grow and take on an atypical appearance, forming microspheroid colonies composed of joined cells (Figure 3B) that occasionally appeared superimposed (Figure 4B). Once the colonies displayed >20 cells, the cells scattered and adopted a spindle shape like classical myoblasts (Figures 4C and 4D). After 12 days, small myotubes positive to embryonic MHCs were observed (Figure 3E). They were thinner than those observed in the cultures derived from cells that more rapidly adhered and also contained a smaller number of nuclei. AC4-like-derived cultures showed the same behavior as those derived from AC4. Indeed, an initial quiescent-like state followed by specific proliferation modalities defined by the formation of microspheroid colonies was also noted (Figure 3C). The exclusive presence of thin myotubes was similarly observed (Figure 3F).

Together these results showed that cells initially defined by their different adhesion abilities could be split into two cell fractions with distinct behavioral characteristics: (i) cells that were adherent during the first 72 hr (e.g., AC1, AC2, and AC3) and that displayed in vitro a typical muscle cell differentiation and (ii) AC4 cells (or AC4-like) that had not yet adhered at that time and that later displayed a specific pattern of proliferation and differentiation into myotubes. The first were referred to as EACs and the second, LACs.

#### Proliferation Ability of MDCs

To assess their proliferation abilities, EACs and LACs were seeded in clonal culture. After 11 days, 645

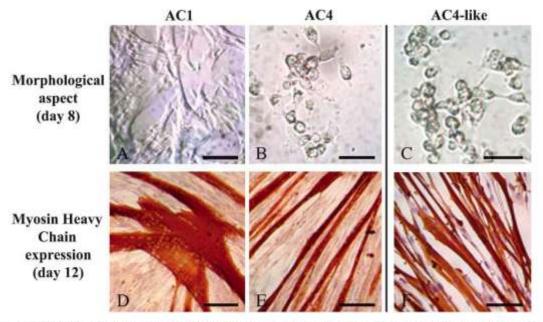


Figure 3 Evolution over time of AC-derived cultures. ACs of each preplate step were detached from gelatin-coated cultureware, seeded in primary culture, examined daily in phase contrast with regard to their morphology (A–C), and tested for embryonic/adult fast myosin heavy chain (MHC) expression (D–F). After B days, AC1-derived cultures displayed >50% confluence and were composed of numerous multinucleated and stellate myotubes (A). At day 12, these myotubes were enlarged by hundreds of nuclei and strongly positive for MHC (D). The same results were found in AC2- and AC3-derived cultures. In contrast, at day 8, cells from AC4-derived cultures appeared exclusively mononucleated with a round shape. Surprisingly, they often formed microspheroid colonies composed of joined cells (B). After 12 days, AC4-derived cultures showed small, thin myotubes that were positive for MHC (E). Cells from AC4-like-derived cultures displayed the same behavior. They initially formed microspheroid colonies of small cells (C) and allowed the formation of thin myotubes after 12 days (F). Based on their clearly distinct in vitro behavior, AC4 were separated from the other ACs (e.g., AC1, AC2, and AC3), which were indexed as early adherent cells (EACs). AC4 cells were qualified as LACs. Bar = 20 µm.

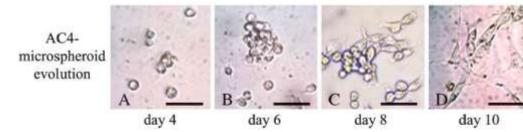


Figure 4 Atypical proliferation modality of LACs. AC4 cells that were adherent after 6 days were detached from gelatin-coated cultureware, seeded in primary culture, and examined daily in phase contrast. After 4 days, they were round, refringent, and remained mononucleated without morphological change (A). They then began to grow and become atypical as they formed microspheroid colonies composed of joined cells that occasionally could also appear superposed (B). On day 8, cells in colonies composed of >20 cells scattered (C) and adopted a spindle-shape like dassical myoblast (D). Bar = 20  $\mu$ m.

clonally derived colonies were identified and tested for their desmin expression to select those with a myogenic origin: 531 clones were composed of desmin positive (desmin<sup>+</sup>) cells, and 114 other clones were composed of desmin negative (desmin ) cells. Myogenic clones were distributed as follows: 313 in EACs and 218 in LACs (Table 2). The average number of nuclei per colony was 224 ± 270 for EACs and 158 ± 185 for LACs. The standard deviation revealed considerable variation in colony sizes. Proliferation ability of EACs was 11/2 times that of LACs (p<0.001). These data confirmed our results in primary culture, indicating that LACs have a lower capacity of proliferation over the first few days compared with EACs. All clonally derived colonies were classified according to the number of nuclei (Table 3): 38.1% of all LAC clonally derived colonies vs. 28.1% of EAC clonally derived colonies displayed <64 nuclei. Also, 17.0% of LAC clonally derived colonies had >256 nuclei vs. 26.5% of EAC clonally derived colonies. The number of poorly proliferative cells was higher in LACs than EACs (p<0.001).

#### Morphometrical Analysis of MDCs

To determine whether LACs could also be identified using specific morphometrical characteristics, EAC and LAC diameters were measured by LUCIA imaging software (Laboratory Imaging) (Figure 5A). As shown in Figure 5B, both cell fractions displayed a wide range of sizes between 5  $\mu$ m and 12  $\mu$ m but showed a clearly different cell distribution based on this morphological

Table 2 Proliferation ability of EACs and LACs

AC type	Colony number	Number of cells in AC clonally derived colonies
EACs .	313	224 ± 270
LACs	218	158 ± 185

EACs and LACs were seeded under clonal conditions and cultured for 11 days. All clonally derived colonies were tested for their desmin expression, in order to determine their myogenic lineage. The number of cells in each myogenic donally derived colony was then determined by counting the nuclei previously stained with Giemsa.

EACs, early adherent cells; LACs, late adherent cells. parameter. Whereas  $37 \pm 7\%$  of EAC had a diameter of <6.5 µm,  $36 \pm 7\%$  had a diameter ranging between 6.5 and 7.5 µm, and  $27 \pm 6\%$  measured >7.5 µm in diameter. With respect to LACs, diameters were as follows:  $73 \pm 6\%$  measured <6.5 µm,  $19 \pm 4\%$  were between 6.5 µm and 7.5 µm, and  $8 \pm 2\%$  were >7.5 µm. Cell mean diameter was  $7.5 \pm 1.7$  µm and  $5.0 \pm 0.2$  µm for EACs and LACs, respectively. LAC mean diameter was lower than that of EAC due to a significantly high proportion of small cells ( $\chi^2$ , p<0.001).

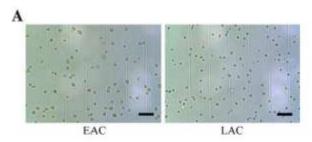
#### Determination of Myogenic Commitment of MDCs

To assess the percentage of cells expressing some proteins in relation to myogenic differentiation status, immunolabeling for M-cadherin, Pax7, and desmin was performed on EAC and LAC fractions immediately after the cells were detached from the gelatin matrix during the preplating technique (Figure 6A). Using QH1 protein expression, possible contamination of both AC fractions by endothelial and hematopoietic cells was also determined (Figure 6B). Immunolabelings revealed that the three muscle proteins were all expressed by both EACs and LACs, but in distinct proportions: indeed, M-cadherin, Pax7, and desmin were observed in a large majority, a low proportion, and ~50% of EACs, respectively. In contrast, M-cadherin+ and Pax7+ cells represented the majority of LACs, whereas LACs expressing desmin were few. M-cadherin+ and desmin+ cells seemed to be more represented in EACs compared with LACs, whereas Pax7+ cells appeared much more numerous in LACs. Concerning the endothelial/ hematopoietic marker, EACs and LACs expressing QH1

Table 3 Distribution of AC clonally derived colonies (%)

AC type	<64 nuclei	64-128 nuclei	128–256 nudei	>256 nuclei
EAC	28,1	17.2	28.2	26.5
LAC	38.1	23.8	21.1	17.0

Based on the number of cells shown in Table 2, clonally derived colonies were classified into four groups.



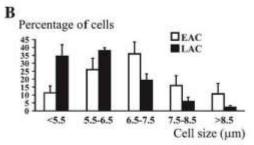


Figure 5 Size analysis of EACs and LACs. Both AC types were observed under a light microscope (A) and measured using an image analysis system to determine their distribution based on size (B). Results are expressed as a mean of at least 300 values, and error bars represent SD values (n=7 experiments for EACs; n=4 experiments for LACs). Cell size was between 5  $\mu$ m and 12  $\mu$ m. EACs displayed 37  $\pm$  7% of the cells with a diameter < 6.5  $\mu$ m. In contrast, 73  $\pm$  6% of all LACs had a diameter < 6.5  $\mu$ m. LACs had more small cells than did EACs (p<0.001). Bar = 40  $\mu$ m.

were rarely observed. As shown in Figure 7, many differences in the number of cells expressing proteins specific to myogenic lineage were indeed confirmed between EACs and LACs ( $\chi^2$ , p<0.001). EACs contained the following percentage of cells: 83.2 ± 2.2% M-cadherin, 11.6 ± 3.5% Pax7, and 41.8 ± 2.9% desmin. In contrast, LACs were characterized as displaying the following phenotype: 62.7 ± 4.8% M-cadherin, 50.0 ± 3.7% Pax7, and 24.4 ± 0.7% desmin. Compared with EACs, LACs showed a lower percentage of cells expressing M-cadherin, a satellite cell-specific marker, but a higher percentage of cells expressing Pax7, a marker limited to cells in the early stages of myogenesis (p < 0.001). Also, cells positive for desmin expression, a marker of committed myoblasts, were less numerous in LACs than EACs (p < 0.001). The percentage of QH1<sup>+</sup> cells was 5.6 ± 1.9% (EACs) and 4.7 ± 0.9% (LACs), indicating that both AC fractions contained few endothelial cells and hematopoietic cells. Moreover, this showed that LACs did not contain many more of these two cell types than EACs. These data show that EACs and LACs corresponded to cell fractions composed of cells that differed by their commitment level in the myogenic pathway.

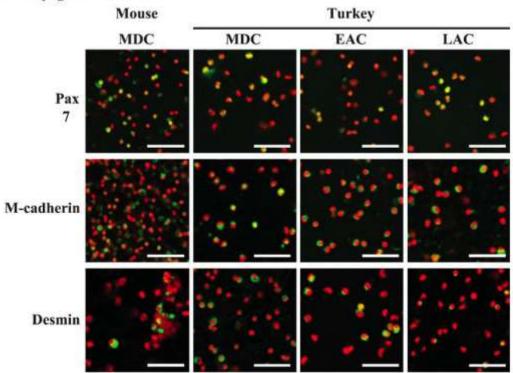
#### Discussion

In this study we compared the characteristics of avian skeletal MDC subpopulations separated according to

their adhesion properties, including in vitro behavior, morphometry, and phenotype. We sought to determine whether this kind of cell sorting could be used in avian models to separate cells displaying varying degrees of myogenic commitment. We also attempted to investigate whether the delayed adhesion might allow us to isolate progenitor cells from MDCs. Using the preplate technique, we found that skeletal MDCs displayed different adhesion properties, allowing us to isolate a marginal cell fraction with clearly delayed adhesion. For the first time, we demonstrated that this initial adhesion defect was not modified by the presence of muscle cells, revealing that it was a major and intrinsic feature of these cells. Moreover, we determined that LACs were not generated from the EAC-derived primary cultures, implying that this marginal cell fraction derived only from the skeletal muscle tissue and could not be assimilated to the descendants of activated satellite cells. Using automated morphometry, we established that LACs contained high numbers of small, round cells. We found that LACs displayed an initial quiescent status followed by atypical proliferation modalities with microspheroid colonies formation, and that these cells were only able to form thin myotubes. Using immunocytochemistry, we showed that LACs were composed of cells at an early stage toward the myogenic differentiation process and had high numbers of progenitor cells. Together these results demonstrate that the delayed adhesion of a marginal fraction of MDCs is a shared biological parameter between mouse and turkey and could be used to isolate cell fractions composed of progenitor cells and cells with limited myogenic differentiation from whole MDCs.

We reported here that LACs could be identified among turkey skeletal MDCs, using the preplate technique developed by Qu et al. (1998). The LAC population, which was finally isolated after 6 days, represented ~1% of the whole extracted mononucleated cells. This result is similar to results published in a previous study performed in mice (Qu-Petersen et al. 2002). An interesting observation was that LACs could also be harvested from the supernatant of MDC-derived primary culture seeded 3 days prior. In this case, LACs represented ~4% of the initially seeded MDCs; this could be due to a less significant cell loss with the simplification of the experimental procedures. The fact that LACs could also be isolated without successive plating clearly shows that they could not be assimilated to detached cells during the repeated steps of the experiment. This means that they represented a constitutive cell fraction of MDCs. Moreover, this result indicated that the adhesion defect was not modulated by the presence or absence of muscle cells. This shows that the initial ineffectiveness of the LACs in adhering was not modified by the paracrine factors secreted by the ACs that were proliferating or differentiating. Additionally, LACs could not be isolated

#### A Myogenic markers



#### B Hematopoietic and endothelial marker

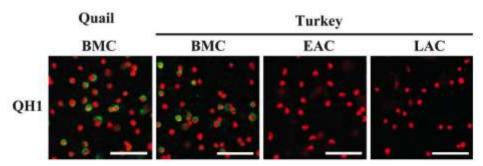


Figure 6 Immunofluorescent labeling of EACs and LACs. Following isolation, cells were deposited on slides (cytospin preparation), and their expression for specific markers of myogenic cells (e.g., M-cadherin, Pax7, and desmin) (A) and endothelial/hematopoietic cells (e.g., QH1 protein) (B) were assessed using immunofluorescence labeling. Mice MDCs and quail bone marrow cells (BMCs) were used as positive controls for the antibody (Ab) specific to muscle cell proteins and QH1 Ab, respectively (see online Supplementary Materials, Figures SF1, SF3–5). In parallel, whole turkey MDCs and BMCs were tested to control Ab reactivity in turkey animals. Following immunolabeling, cells were counterstained with propidium iodide, and slides were viewed by confocal laser scanning microscopy. Immunolabelings revealed that three muscle-specific proteins were expressed by both EACs and LACs, but with distinct proportions especially for Pax7 and desmin. M-cadherin\* cells that represented the majority of cells in both fractions seemed to be more numerous in EACs than in LACs. Pax7 appeared to be expressed by fewer EACs than LACs, Inversely, the proportion of desmin\* EACs was higher compared with LACs. Concerning the endothelial/hematopoietic marker, EACs and LACs expressing QH1 were rarely observed.

from the EAC-derived primary cultures, which reinforced the notion that these cells derive only from skeletal muscle tissue. Also, this evocated that LACs could not correspond to the descendants of activated satellite cells, like "reserve" cells resulting from their asymmetrical division (Yoshida et al. 1998), or that specific signals/stimuli would be required to generate LAC from satellite cells.

Immediately after their adhesion, LACs were characterized as highly enriched in small cells compared with EACs. They did not show any proliferation during

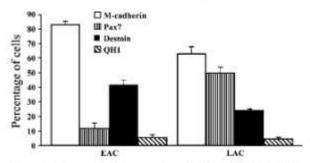


Figure 7 Phenotypic characterization of EACs and LACs. Both AC types were immunolabeled with Ab specific to M-cadherin, Pax7, desmin, and QH1 protein, and the proportion of positive cells for each marker was determined. Results are expressed as a mean of at least 200 values, and error bars represent SD values (n=4 experiments for EACs and LACs). LACs displayed 62.7 ± 4.8% of Mcadherin $^+$  cells compared with 83.2  $\pm$  2.2% in EACs. LACs were characterized by 50.0  $\pm$  3.7% of Pax7 $^+$  cells, which is considerably higher than in EACs where 11.6 ± 3.5% of cells expressed this transcription factor. Inversely, the proportion of desmin\* cells in LACs (24.4 ± 0.7%) was much smaller than observed in EACs, which represented 41.8 ± 2.9%. These findings showed clear-cut differences in the expression for myogenic markers between EACs and LACs (p<0.001). EACs were enriched in activated myogenic cells, whereas LACs contained non-myogenic cells and cells with limited myogenic commitment. In EACs and LACs, the percentage of cells was  $5.6 \pm 1.9\%$  and  $4.7 \pm 0.9\%$ , respectively, indicating that both AC fractions contained only a few endothelial cells and hematopoietic cells.

the first week. During the following week, LACs slowly began to atypically proliferate as round cells and formed few microspheroid colonies of mononucleated cells, as previously described for some mice MDC fractions (Tamaki et al. 2003). They then showed a specific ability to differentiate into myotubes, as noted by the formation of very thin myotubes after 2 weeks. Interestingly, myosphere formation (e.g., clusters of cells) was also recently described from mice slow adherent myogenic cells that were maintained in suspension. Also, when myospheres grown in gelatin-coated plates are left for several days, many adhered as single rounded cells and formed very thin myotubes (Sarig et al. 2006). Our findings, which were consistent with analyses performed in mice (Rando and Blau 1994; Qu et al. 1998; Lee et al. 2000; Qu and Huard 2000), indicated that the late preplate cells displayed a smaller diameter and tended to be morphologically round, compared with the early preplate cells. Moreover, the late preplate cells were distinguished from early plate cells by slow division and poor ability to fuse (Torrente et al. 2001; Qu-Petersen et al. 2002). Additionally, it is clear that muscle-derived SP cells, a small fraction of adult stem cells purified using Hoechst 33,342 staining/FACS methods, also were small and spherical (Gussoni et al. 1999; Majka et al. 2003; Benchaouir et al. 2004). They remained mononucleated without displaying any proliferation activity for over a week and showed poor, delayed muscle differentiation, whereas the non-SP cells were fully differentiated into myotubes after 1 week. Together these comparative results suggested that the LACs shared several morphometrical and proliferation/ fusion characteristics with identified primitive cells.

Phenotype characterizations of late preplate cells revealed that they contained cells at different stages of differentiation. Concerning myogenic marker expression, important differences between studies were noted about desmin and M-cadherin proteins. Initial research (Qu et al. 1998; Lee et al. 2000; Deasy et al. 2001; Jankowski et al. 2001) indicated that the sequential preplates were enriched in their content of myogenic precursors based on expression of desmin, a marker of committed myoblasts (Cornelison and Wold 1997; Sabourin et al. 1999). In contrast, Qu-Petersen et al. (2002) showed that, although >95% of cells in expanded cell cultures expressed desmin, only 30%-40% were found to be desmin\* at an earlier passage. Additionally, the late preplate cells were defined either by >90% of M-cadherin-expressing cells (Jankowski et al. 2002a) or by a relatively low percentage of the same cells (Lee et al. 2000; Qu-Petersen et al. 2002), as only 5%-30% of cells expressed this satellite cellspecific marker (Moore and Walsh 1993; Irintchev et al. 1994). Using different markers exhibited by the subpopulations of hematopoietic stem cells (Gussoni et al. 1999; Ziegler et al. 1999), several studies reported the existence of stem cells among the late preplate cells (Lee et al. 2000; Jankowski et al. 2001; Qu-Petersen et al. 2002; Sarig et al. 2006). Then, part of the late preplate cells, which were myogenic lineage, were identified as Sca1+, CD34+1 , CD45 , and c-kit . Here we have attempted to define the LAC fraction by labeling different proteins according to myogenic commitment, to gauge their respective progression toward end-stage myogenic differentiation. In agreement with the results obtained in mice (Lee et al. 2000; Qu-Petersen et al. 2002), we noticed that LACs displayed a higher proportion of M-cadherin cells and desmin cells compared with EACs. This revealed that LAC fraction was enriched in myogenic lineage cells. We were able to observe that endothelial and hematopoietic cells were poorly represented in the LAC fraction, and that a considerable proportion (~40%) of non-myogenic cells in LACs could not be attributed to an increase in both cell types. In light of this, it might be suggested that the LAC-derived myogenic lineage cells are essentially progenitor cells and a much smaller proportion are quiescent satellite cells and, as described, some do not express M-cadherin and desmin (Cornelison and Wold 1997). Taking into account the similarities noted in vitro among the LACs and the late preplate cells selected in mice, we may hypothesize that the myogenic lineage cells may contain some muscle-derived stem cells. Unfortunately, absence of antibodies against hematopoietic

stem cells markers for our animal model did not allow us to determine whether some LACs showed markers common to stem cells. The percentage of M-cadherin<sup>+</sup> cells obtained in the LAC fraction appeared higher than that reported in previous studies performed in mice, suggesting that our fraction was not as purified in immature progenitors of satellite cells.

Pax7 has been reported to play an essential role in satellite cell biogenesis by restricting alternate developmental programs (Seale et al. 2000; Oustanina et al. 2004). This paired box transcription factor was expressed in both quiescent and activated satellite cells, as well as in proliferating primary myoblasts. However, it was inhibited after myogenic differentiation (Seale et al. 2000; Halevy et al. 2004). For the first time, its expression was assessed in freshly isolated cell fraction resulting from the preplate technique. We showed that ~50% of LAC were Pax7+ compared with <15% in EACs, which confirmed that these two cell fractions contained some subpopulations displaying distinct degrees of myogenic commitment. Similarly, ~70% of cells forming myospheres expressed Pax7 (Sarig et al. 2006). The low percentage of Pax7+ cells in EACs would support the hypothesis that this cell fraction contained a significant proportion of late myogenic precursors that entered into terminal differentiation. Also, it appeared that nearly all M-cadherin+ LACs were Pax7+, which was consistent with the results of our proliferation/fusion studies and supported the notion that LAC fraction was partly composed of myogenic cells at an early stage.

In conclusion, our observations with regard to the MDC separation resulting from the preplate technique provide evidence that differential adhesion properties can be used in avian models to purify different myogenic cell subpopulations. This approach enables not only the separation of cells based on their ability to proliferate and differentiate, but also the extraction of immature progenitors of satellite cells from whole MDCs. Further experiments are required to explore the degree of interaction of these progenitor cells with satellite cells and the biological signals that control their behavior in muscle niche.

#### Acknowledgments

This work was supported by grants from the Association Française contre les Myopathies.

The authors thank P. Guyot for assistance with animal care and facilities. We are grateful to E. Bandman and P.Y. Rescan for their generous supply of antibodies. Monoclonal antibodies specific for Pax7 (PAX7), vimentin (AMF-17b), and endothelial cell surface (QH1) developed here by us were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank under the auspices of the National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, MD and maintained by the Department of Biological Sciences, University of Iowa, Iowa City, IA.

#### Literature Cited

- Bandman E, Bennett T (1988) Diversity of fast myosin heavy chain expression during development of gastrocnemius, bicep brachii, and posterior latissimus dorsi muscles in normal and dystrophic chickens. Dev Biol 130:220–231
- Baroffio A, Hamann M, Bernheim L, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Bader CR (1996) Identification of self-renewing myoblasts in the progeny of single human muscle satellite cells. Differentiation 60:47–57
- Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, et al. (2000) Expression of CD34 and MyfS defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. J Cell Biol 151:1221–1234
- Benchnouir R, Rameau P, Decraene C, Dreyfus P, Israeli D, Pietu G, Danos O, et al. (2004) Evidence for a resident subset of cells with SP phenotype in the C2C12 myogenic line: a tool to explore muscle stem cell biology. Exp Cell Res 294:254–268
- Bischoff R (1986) A satellite cell mitogen from crushed adult muscle. Dev Biol 115:140–147
- Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K, Ivanova S, Streubel B, Hauser E, Freilinger M, et al. (1999) Recruitment of bone-marrowderived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. Anat Embryol (Berl) 199:391–396
- Briguet A, Courdier-Fruh I, Foster M, Meier T, Magyar JP (2004) Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the mdx-mouse. Neuromusc Dis 14:675–682
- cular dystrophy in the mdx-mouse. Neuromusc Dis 14:675–682 Campion DR (1984) The muscle satellite cell: a review. Int Rev Cytol 87:225–251
- Carlsson L, Thornell LE (2001) Desmin-related myopathies in mice and man. Acta Physiol Scand 171:341–348
- Cerny LC, Bandman E (1987) Expression of myosin heavy chain isoforms in regenerating myotubes of innervated and denervated chicken pectoral muscle. Dev Biol 119:350–362
- Cornelison DD, Wold BJ (1997) Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. Dev Biol 191:270–283
- Cossu G, Molinaro M (1987) Cell heterogeneity in the myogenic lineage. Curr Top Dev Biol 23:185–208
- Darr KC, Schultz E (1987) Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle. J Appl Physiol 63:1816–1821
   De Angelis L, Berghella L, Coletta M, Lattanzi L, Zanchi M,
- De Angelis I., Berghella I., Coletta M., Lattanzi I., Zanchi M., Cusella-De Angelis MG, Ponzetto C, et al. (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
  Deasy BM, Jankowski RJ, Huard J (2001) Muscle-derived stem cells:
- Deasy BM, Jankowski RJ, Huard J (2001) Muscle-derived stem cells: characterization and potential for cell-mediated therapy. Blood Cells Mol Dis 27:924–933
- Dolapchieva S, Eggers R, Kuhnel W (2000) Automatic analysis of the postnatal growth of axons and myelin sheaths in the tibial and peroneal nerves of the rabbit. Ann Anat 182:133–142
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F (1998) Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science 279:1528–1530 Galli R, Borello U, Gritti A, Minasi MG, Bjornson C, Coletta M,
- Galli R, Borello U, Gritti A, Minasi MG, Bjornson C, Coletta M, Mora M, et al. (2000) Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. Nat Neurosci 3:986–991
- Gibson MC, Schultz E (1983) Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells. Muscle Nerve 6:574–580
- Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, et al. (1999) Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. Nature 401;390–394
- Halevy O, Piestun Y, Allouh MZ, Rosser BW, Rinkevich Y, Reshef R, Rozenboim I, et al. (2004) Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal. Dev Dyn 231:489-502
- Irintchev A, Zeschnigk M, Starzinski-Powitz A, Wernig A (1994) Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles. Dev Dyn 199:326–337
- Jackson KA, Mi T, Goodell MA (1999) Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci USA 96:14482–14486

- Jankowski RJ, Deasy BM, Cao B, Gates C, Huard J (2002a) The role of CD34 expression and cellular fusion in the regeneration capacity of myogenic progenitor cells. J Cell Sci 115:4361–4374
- Jankowski RJ, Deasy BM, Huard J (2002b) Muscle-derived stem cells. Gene Ther 9:642-647
- Jankowski RJ, Haluszczak C, Trucco M, Huard J (2001) Flow cytometric characterization of myogenic cell populations obtained via the preplate technique: potential for rapid isolation of musclederived stem cells. Hum Gene Ther 12:619–628
- Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM (2002) Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. Exp Hematol 30:896–904
- Lagord C, Soulet L, Bonavaud S, Bassaglia Y, Rey C, Barlovatz-Meimon G, Gautron J, et al. (1998) Differential myogenicity of satellite cells isolated from extensor digitorum longus (EDL) and soleus rat muscles revealed in vitro. Cell Tissue Res 291:455–468
- Lee JY, Qu-Petersen Z, Cao B, Kimura S, Jankowski R, Cummins J, Usas A, et al. (2000) Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. J Cell Biol 150:1085–1100
- Majka SM, Jackson KA, Kienstra KA, Majesky MW, Goodell MA, Hirschi KK (2003) Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration. J Clin Invest 111:71–79
- Maruyama K, Kanemaki N (1991) Myosin isoform expression in skeletal muscles of turkeys at various ages. Poult Sci 70:1748–1757
- Mauro A (1961) Satellite cells of skeletal muscle fibers. J Biophys Biochem Cytol 9:493–495
- McFarland DC, Doumit MF, Minshall RD (1988) The turkey myogenic satellite cell: optimization of in vitro proliferation and differentiation. Tissue Cell 20:899–908
- McFarland DC, Gilkerson KK, Pesull JE, Walker J, Yun Y (1995a) Heterogeneity in growth characteristics of satellite cell populations. Cytobios 82:21-27
- McFarland DC, Pesall JE, Gilkerson KK (1993) The influence of growth factors on turkey embryonic myoblasts and satellite cells in vitro. Gen Comp Endocrinol 89:415–424
- McFarland DC, Pesall JE, Gilkerson KK, Ferrin NH (1995b) The response of growth factors of cultured satellite cells derived from turkeys having different growth rates. Cytobios 82:229–238
- Molnar G, Ho ML, Schroedl NA (1996) Evidence for multiple satellite cell populations and a non-myogenic cell type that is regulated differently in regenerating and growing skeletal muscle. Tissue Cell 28:547–556
- Moore R, Walsh FS (1993) The cell adhesion molecule M-cadherin is specifically expressed in developing and regenerating, but not denervated skeletal muscle. Development 117:1409–1420
- Moss F, Leblond C (1970) Nature of dividing nuclei in skeletal muscle of growing rats. J Cell Biol 44:459–462
- Nguyen F, Guigand L, Goubault-Leroux I, Wyers M, Cherel Y (2005) Microvessel density in muscles of dogs with golden retriever muscular dystrophy. Neuromusc Dis 15:154–163
- Oustanina S, Hause G, Braun T (2004) Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. EMBO J 23:3430-3439
- Pardanaud L, Altmann C, Kitos P, Dieterlen-Lievre F, Buck CA (1987) Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. Development 100:339–349
- Qu Z, Balkir L, van Deutekom JC, Robbins PD, Pruchnic R, Huard J (1998) Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy. J Cell Biol 142:1257–1267
- Qu Z, Huard J (2000) Matching host muscle and donor myoblasts

- for myosin heavy chain improves myoblast transfer therapy. Gene Ther 7:428-437
- Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cummins J, Pruchnic R, Mytinger J, 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 TA, Blau HM (1994) Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. J Cell Biol 125:1275–1287
- Rantanen J, Hurme T, Lukka R, Heino J, Kalimo H (1995) Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. Lab Invest 72:341–347
- Richler C, Yaffe D (1970) The in vitro cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. Dev Biol 23:1–22
- Rouger K, Brault M, Daval N, Leroux I, Guigand L, Lesoeur J, Fernandez B, et al. (2004) Muscle satellite cell heterogeneity: in vitro and in vivo evidences for populations that fuse differently. Cell Tusue Res 317:319–326
- Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Seale P, Asakura A, Rudnicki MA (1999) Reduced differentiation potential of primary MyoD<sup>-/-</sup> myogenic cells derived from adult skeletal muscle. J Cell Biol 144:631-643
- Sarig R, Baruchi Z, Fuchs O, Nudel U, Yaffe D (2006) Regeneration and transdifferentiation potential of muscle-derived stem cells propagated as myospheres. Stem Cells 24:1769–1778
- Schultz E, Gibson MC, Champion T (1978) Satellite cells are mitorically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. J Exp Zool 206:451–456
- Schultz E, Jaryszak DL (1985) Effects of skeletal muscle regeneration on the proliferation potential of satellite cells. Mech Ageing Dev 30-63. 73
- Schultz E, McCormick KM (1994) Skeletal muscle satellite cells. Rev Physiol Biochem Pharmacol 123:213–257
- Seale P, Rudnicki MA (2000) A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. Dev Biol 218:115–124
- Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA (2000) Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. Cell 102:777-786
- Snow MH (1977) The effects of aging on satellite cells in skeletal muscles of mice and rats. Cell Tissue Res 185:399–408
- Tamaki T, Akatsuka A, Okada Y, Matsuzaki Y, Okano H, Kimura M (2003) Growth and differentiation potential of main- and sidepopulation cells derived from murine skeletal muscle. Exp Cell Res 291:87-90
- Torrente Y, Tremblay JP, Pisati F, Belicchi M, Rossi B, Sironi M, Fortunato F, et al. (2001) Intraarterial injection of muscle-derived CD34\*Sca-1\* stem cells restores dystrophin in mdx mice. J Cell Biol 152:335–348
- Yoshida N, Yoshida S, Koishi K, Masuda K, Nabeshima Y (1998) Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myt-S generates 'reserve cells', J Cell Sci 111:769–779
- MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. J Cell Sci 111:769-779 Young HE, Duplau C, Young TM, Floyd JA, Reeves ML, Davis KH, Mancini GJ, et al. (2001a) Clonogenic analysis reveals reserve stem cells in postnatal mammals. I. Pluripotent mesenchymal stem cells. Anat Rec 263:350-360
- Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, et al. (2001b) Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermin derived from fetal, adult, and geriatric donors. Anat Rec 264:51-62
- Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA, De Maria R, Muller R, Masella B, Gabbianelli M, et al. (1999) KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. Science 285:1553–1558

# Il Evaluation de l'efficacité en transplantation musculaire de MDSC dans le modèle canin de la DMD

# II.1. Position du problème

Dans l'article précédent, nous avons montré que l'adhérence permettait de séparer les MDC sur la base de leur engagement dans le programme myogénique. En effet, la technique d'ensemencements successifs est adaptable à d'autres espèces que la souris et le retard initial d'adhérence permet d'isoler une fraction marginale composée de progéniteurs immatures et faiblement engagés dans la voie myogénique. Cette fraction, riche en cellules de petite taille, correspond à une population résidente du tissu musculaire et qui n'est pas générée *in vitro* par les myoblastes.

Fort de ces résultats, l'objectif du travail suivant a été d'isoler et de caractériser des LAC chez le chien. Ceci de façon à évaluer leur efficacité en transplantation chez le chien GRMD (*Golden Retriever Muscular Dystrophy*).

# II.2. Matériel et méthodes

Les MDC ont été extraites de muscle de chien sain puis soumises à la technique d'ensemencements successifs dite « preplating ». Préalablement à l'étude in vivo, il a été nécessaire de phénotyper et de caractériser les sous-populations de MDC. Les cellules d'intérêts ont été ensuite transduites pour pouvoir les marquer à la  $\beta$ -galactosidase avant d'être injectées chez des chiens dystrophinopathes immuno-supprimés par voie intramusculaire.

#### II.2.1. Animaux

Les chiens proviennent du centre de Thérapie Génique de Boisbonne (Ecole Vétérinaire de Nantes). Le diagnostic de la dystrophinopathie est effectué dans les premiers jours suivant la naissance par PCR après amplification de l'ADN génomique des leucocytes sanguins. Trois chiens Golden Retriever sains âgés de un mois ont été utilisés comme donneurs de cellules musculaires. Deux chiens dystrophinopathes âgés de trois mois ont subit le protocole expérimental de transplantation cellulaire.

#### II.2.2. Matériel musculaire

Les chiens sains ont été euthanasiés par injection intraveineuse de pentobarbital sodique après anesthésie associant kétamine (8 mg/kg) et xylazine (0,1 mg/kg). Les muscles des membres antérieurs et postérieurs ont été prélevés à l'aide d'instruments stériles. Les prélèvements ont été placés dans une solution de PBS (Phosphate Buffered Saline, Cambrex Bioscience) contenant 2% d'un mélange d'antibiotiques et d'antifongiques (PSF, Sigma) : pénicilline (100 UI/ml)-streptomycine (0,1 mg/ml) et amphotéricine B (FungizoneND ; 0,25 µg/ml).

### II.2.3. Extraction de MDC

L'extraction de MDC chez le chiene est réalisée selon le même protocole que chez la dinde. Cependant, La phase de digestion est réalisée à l'aide d'une solution enzymatique de collagénase et de hyaluronidase (Sigma) dans un premier temps puis de protéase dans un second temps. La digestion est terminée par une centrifugation de 5 minutes à 150 G. Le surnageant est récupéré et additionné à du milieu M199 (VWR International) contenant 1% de PSF (M199-1%PSF).

# II.2.4. Technique d'ensemencements successifs : « preplating »

La technique de « preplating » utilisée chez le chien est la même que celle qui a été décrite chez la dinde dans la première partie du travail expérimental.

# II.2.5. Phénotype des LAC et des EAC

Le phénotype des LAC a été déterminé par immunocytochimie sur culots cellulaires de centrifugation (cytospins) et en cytométrie en flux, afin de comparer les caractéristiques de cette population isolée par la technique d'ensemencement successifs. Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus avec les EAC.

# II.2.5.1. Immunohistochimie sur cytospins : Marqueurs myogéniques et endothéliaux

Le phénotype myogénique et endothélial des cellules a été déterminé par immunocytochimie sur cytospins. Pour chaque population cellulaire, l'expression du CD31 (PECAM) a été testée pour évaluer la proportion d'une éventuelle contamination par des cellules endothéliales. Afin d'analyser le niveau d'engagement myogénique, l'expression de M-cadhérine, c-Met, Pax7, MyoD, vimentine et desmine a été mesuré. L'ensemble des anticorps primaires utilisés sont répertoriés dans le tableau 10.

		Espèce cible	Références de l'anticorps
Marqueurs myogéniques	M-cadhérine	Homme	H71, 1:50; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA
	c-Met	Homme	C12, 1:50; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA
	Pax7	Poulet	mAb, PAX7, 1:10; DSHB
	MyoD1	Homme	mAb, 5.8A, 1:10; Dako, Trappes, France
	Vimentine	Poulet	mAb, AMF-17B, 1:10; DSHB
	Desmine	Homme	mAb, DE-R-11, 1:50; Dako, Trappes, France
Marqueurs endothéliaux	CD31 (PECAM)	Homme	mAb, JC 70A, 1:40; Dako, Trappes, France

Tableau 10 : Anticorps primaires utilisés en immunohistochimie sur cytospins

Deux millions de cellules sont prélevés, centrifugés (1500 rpm, 10 minutes) et repris en suspension avec 550 μL de PBS. Dix microlitres, soit 40 000 cellules, sont utilisés pour la préparation des culots sur lame Polysine<sup>TM</sup>, à l'aide d'un Cytospin (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA). Les lames sont ensuite conservées à -20°C.

Les lames sont traitées au Triton X-100 à 0,5% pendant 30 minutes, afin de perméabiliser les membranes, puis incubées pendant 20 minutes avec une solution de blocage (2% de sérum de chèvre, 5% de sérum de chien et 2% de BSA, dilués dans du PBS), de façon à saturer les sites de fixation non spécifiques avant l'incubation avec l'Ac primaire (1 heure, 37°C ou 1 nuit à 4°C). Après une série de trois rinçages en PBS, les lames sont mises à incuber avec l'Ac secondaire (1 heure, température ambiante). L'Alexa 488 anti-lapin (dilution, 1:200; Molecular Probes) et l'Alexa 488 anti-souris (dilution, 1:200; Molecular Probes) sont utilisés. Après trois rinçages dans du PBS, les lames sont montées avec du milieu de montage contenant le colorant nucléaire DAPI (4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole; Vector Laboratories). Les immunomarquages sont observés et analysés par microscopie confocale (TE2000 Nikon).

La proportion de cellules marquées par les différents Ac est déterminée à l'aide du logiciel d'analyse LUCIA (Laboratory Imaging). Les résultats sont présentés sous la forme de moyennes et d'écart-types obtenus à partir d'expériences indépendantes.

# II.2.5.2. Cytométrie en flux : Marqueurs de cellules souches hématopoïétiques et de molécules d'adhérence

Les EAC et les LAC ont été analysées par cytométrie en flux pour l'expression de protéines membranaires. Les cellules sont prélevées, centrifugées (1500 rpm, 10 minutes) et reprises en suspension avec du PBS contenant 1% de BSA. Toutes les manipulations ont été réalisées à 4°C.

Les cellules ont été incubées avec l'anticorps primaire pendant 45 minutes. Après rinçages et centrifugations, les cellules sont mises en présence de l'anticorps secondaire pendant 30 minutes. Les cellules subissent alors un dernier rinçage et sont reprises dans une solution de PBS-1%BSA contenant 5 µg/ml de 7-aminoactinomycine D (7-AAD, Sigma, St Louis, MO).

Les analyses cytométriques ont été réalisées à l'aide d'un FACSCalibur (Becton-Dickinson). L'ensemble des anticorps primaires utilisés sont répertoriés dans le tableau 11. Pour chaque anticorps, des isotypes spécifiques ont été utilisés comme contrôle négatif. Les résultats sont présentés sous la forme de moyennes et d'écart-types obtenus à partir d'expériences indépendantes.

		Conjugaison	Références de l'anticorps (Clone et fournisseur)
Marqueurs de cellules souches	CD45	FITC	YKIX 716.13 (Serotec)
hématopoïétiques	CD34	PE	1H6 (BD)
	CD34	APC	2E9 (BD)
	c-kit	APC	YB5.B8 (BD)
	ABCG2	PE	5D3 (eBioscience)
	MDR	PE	17F9 (BD)
	Flk1	PE	Avas 12.1 (BD)
Marqueurs lymphoïdes	B-marker	PE	CA2.1D6 (Serotec)
	CD4	PE	YKIX 302.9 (Serotec)
	CD5	PE	YKIX 322.3 (Serotec)
	CD8	PE	YCATE 55.9 (Serotec)
Marqueurs myéloïdes	CD11a	FITC	CA11.4D3 (Moore)
	CD11b	FITC	CA16.3E10 (Moore)
	CD18	FITC	CA1.4E9 (Moore)
	CD14	APC	M5E2 (BD)
Molécules d'adhérence	CD62-L	PE	SK11 (BD)

Tableau 11 : Anticorps primaires utilisés en cytométrie en flux

II.2.6. Comportement in vitro des LAC et des EAC

II.2.6.1. Prolifération et différenciation

Les capacités prolifératives des LAC et des EAC ont été évaluées en cultures clonales selon le

même protocole que celui décrit dans le travail précédent.

Comme chez la dinde, l'observation quotidienne des cultures en contraste de phase à l'aide d'un

microscope inversé a permis de comparer la différenciation des EAC et des LAC en cultures

primaires.

II.2.6.2. Plasticité

Les capacités de différenciation des cellules isolées par la technique de preplating vers la lignée

adipogénique et ostéogénique ont été évaluées afin de mettre en évidence leur capacité à se

différencier en types cellulaire variés. Ces résultats ont été obtenues grâce à une collaboration

développée avec l'Unité ESPRI INSERM EA3249 (B. Delorme et P. Charbord ; Tours). Après

trypsination, la suspension cellulaire est séparée en deux fractions pour des cultures dans deux

milieux spécifiques de différenciation. L'ensemencement se fait à 20.000 cellules / cm² sur des

Labteks (Nunc; VWR international SA; Fontenay sous bois, France).

Différenciation adipogénique

Les cellules ont été placées pendant 14 jours dans un milieu d'induction adipogénique constitué

de Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) contenant 1 g/L de glucose (Invitrogen), 10%

de SVF (Hyclone), 1 µM de dexaméthasone (Sigma), 0,5 mM d'isobuthylmethylxanthine (IBMX,

Sigma) et 60 µM d'indométacine (Sigma). Le milieu est renouvelé tous les deux jours.

Analyse colorimétrique : Coloration rouge de Nil

La culture cellulaire placée en milieu de différenciation adipocytaire depuis 14 jours est fixée en

formaldéhyde 4% pendant 10 minutes après avoir été rincée avec du PBS 1X. Le marquage des

vésicules lipidiques se fait à l'obscurité par l'ajout de Rouge de NIL à 1µg/mL dans du PBS 1X

pendant 30 minutes à 4°C. La Lame est ensuite rincée et montée en DAPI Vectashield (AbCys)

126

pour visualiser le noyau. L'analyse se fait par fluorescence à 488 nm (coloration jaune) ou 580 nm (coloration rouge). Les cellules différenciées en adipocytes peuvent être facilement visualisées par l'accumulation intracytoplasmique de volumineuses vacuoles lipidiques, de diamètre supérieur à 5 µm de diamètre.

Analyse moléculaire : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

La différenciation en cellules adipogéniques est confirmée par RT-PCR utilisant des promoteurs d'ARNm spécifiques d'adipocytes comme le PPARγ, la lipoprotéine lipase (LPL) et l'adiponectine (Tab.12). Pour cela, l'ARN total des cellules est extrait à l'aide d'un kit commercial (RNA easy kit, Qiagen SA., Courtaboeuf, France). 50 ng d'ARN sont alors analysés à l'aide d'un Super-Script One-Step RT-PCR associé à un système Platinum Taq (Invitrogen). Les fragments d'ADNc amplifiés sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (2%), marqués au bromure d'éthydium et photographiés sous rayonnement ultraviolet.

Noms	Longueurs (pb)	Séquences	
Adiponectine-AS	24	CCACGTTCTTCTCCTGGTACTGGT	Région (154-694) de l'adiponectine canine
Adiponectine-S	20	CGTGATGGCAGAGATGGCAC	
LPL-AS	25	TGCTATTTGGCCACTATACTCCTCA	Région (261-864) de la lipoprotéine (LPL) canine
LPL-S	23	AACCAGGCCTTCGAGATCTCTCT	
PPARγ-AS	21	TTCCTTCTCAGCCTGTGGCAT	Région (314-841) du peroxisome proliferator-activated
PPARγ-S	24	GAAGACATTCCATTCTCAAGAGCG	receptor γ (PPARγ) canin

Tableau 12 : Amorces nucléotidiques (primers) utilisés en RT-PCR

La différenciation en cellules adipogéniques est évaluée par RT-PCR utilisant des amorces Antisens (AS) et Sens (S) spécifiques de l'adiponectine canine, de la lipoprotéine (LPL) canine et du peroxisome proliferatoractivated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) canin.

#### Différenciation ostéogénique

Les cellules ont été placées pendant 21 jours dans un milieu d'induction ostéogénique constitué de Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) à 4,5 g/L de glucose (Invitrogen) complété de 10% de SVF (Hyclone), de 0,1 µM de dexaméthasone (Sigma), 25 µg/mL d'acide L-ascorbique (Sigma) et de 3 mM de dihydrogénophosphate de sodium (NaH2PO4, Sigma). Un renouvellement du milieu est effectué tous les deux jours et la différenciation complète dure 21 jours.

#### Analyse colorimétrique : Coloration Von Kossa et Rouge d'Alizarine

La coloration Von Kossa permet la mise en évidence de la minéralisation de la matrice osseuse. Elle révèle les sels de calciums (phosphate, carbonate, sulfate, oxalate) en le substituant par un cation métallique, le nitrate d'Argent, qui après réduction par les ultra-violets (UV) mènera à une coloration noire de la culture cellulaire. Les cellules en milieu de différenciation ostéoblastique depuis 21 jours sont fixées en formaldéhyde, rincées puis mises au contact d'une solution de Nitrate d'Argent 5% (Sigma) dans de l'eau distillée pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. La culture est lavée dans de l'eau distillée et mise sur une table UV de 10 minutes à 1 heure, le temps d'observer la formation de zone sombre sous microscope. La réaction est arrêtée par une solution de thiosulfate de sodium 5% pendant 2 minutes.

La coloration Rouge d'Alizarine est une seconde technique pour identifier les dépôts de calcium durant le processus de différenciation ostéoblastique. Lors de cette coloration, le calcium est complexé par chélation sous forme « Rouge d'Alizarine - calcium » (complexe rouge). Une culture cellulaire en milieu de différenciation depuis 21 jours fixée en formaldéhyde est mise au contact d'une solution de Rouge d'Alizarine (Sigma) à 2% dans de l'eau distillée ajustée à pH 4,2. La coloration est réalisée sous microscope afin de visualiser la formation de complexes rouges. Lorsque ceux-ci deviennent rouges vifs, la coloration doit être arrêtée par des rinçages successifs en eau distillée. Les sels de calcium présents dans la culture cellulaire sont observés en rouge.

# II.2.7. Greffes hétérologues de LAC et de EAC

Les deux populations de cellules isolées par preplating ont été amplifiées et transduites par un rétrovirus de façon à pouvoir ultérieurement les repérer par l'intermédiaire de leur noyau dans les muscles injectés. Après avoir contrôlé l'efficacité de la transduction, les populations ont été injectées par voie intramusculaire chez des chiens immunosupprimés. Les différents muscles injectés ont été prélevés 4 semaines plus tard et analysés par des méthodes histologiques et immunohistochimiques. Le protocole expérimental est présenté dans la figure 24.

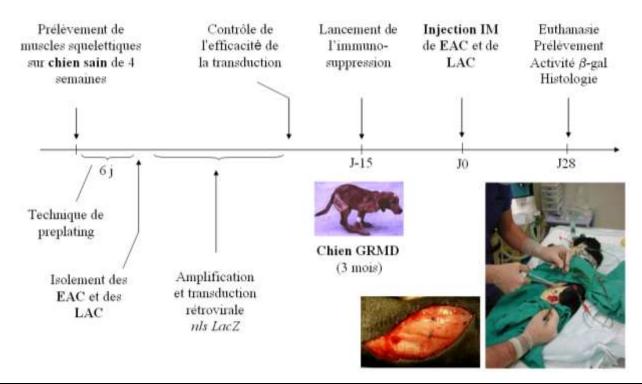


Figure 24 : Protocole général d'injections intramusculaires de EAC et de LAC chez un chien dystrophinopathe

Le protocole expérimental a nécessité l'isolement des EAC et des LAC à partir de muscles périphériques de chiens sains âgés de 4 semaines par la technique de preplating. Les cellules ont été amplifiées et transduites avec un rétrovirus *nls-LacZ* de façon à pouvoir ultérieurement les repérer par l'intermédiaire de leur noyau dans les muscles injectés. Après avoir contrôlé l'efficacité de la transduction, les 2 populations ont été injectées chez des chiens immuno-supprimés par voie intramusculaire (IM). Les différents muscles injectés ont été prélevés après 4 semaines et analysés par des méthodes histologiques et immunohistochimiques.

# II.2.7.1. Marquage des cellules par un rétrovirus recombinant

Les EAC et les MDSC sont transduites par des particules rétrovirales recombinantes *nls-LacZ*. Le vecteur rétroviral *nls-LacZ* TG est produit par des lignées cellulaires TE671 transformées (Cosset et al., 1990; Takeuchi et al., 1994) gracieusement fournies par J.L. Cosset. Le titre en particules virales est déterminé et fixé à 1.10<sup>6</sup> CFU/ml. Les cellules sont ensemencées sur des boîtes de culture préalablement gélatinées et placées dans un incubateur à 37°C et à 5% de CO<sub>2</sub> pendant une nuit. L'infection est réalisée par l'adjonction de particules rétrovirales et de 8 μg/ml de polybrène (Sigma) au milieu de prolifération. Toutes les 24 heures, les infections virales sont répétées par renouvellement du milieu de culture et ceci pendant 5 à 6 jours. Un contrôle de l'efficacité de la transduction est réalisé à terme par comptage du nombre de noyaux β-gal-positifs après révélation. Un taux de 85% de noyaux β-gal-positifs est jugé satisfaisant.

# II.2.7.2. Immunosuppression

Les chiens dystrophinopathes receveurs de la greffe hétérologue ont subit un protocole d'immuno-suppression débutant quinze jours avant l'intervention et se prolongeant jusqu'à l'euthanasie. Ils ont reçu quotidiennement par voie orale de la cyclosporine (14 mg/kg le matin ; 18 mg/kg le soir) en association avec du mycophenolate mofetil (400 mg/m²) et du kétoconazole (10 mg/kg). Le taux plasmatique de cyclosporine a été contrôlé deux fois par semaine et le traitement est modulé jusqu'à l'obtention d'une cyclosporinémie comprise entre 300 et 400 ng/ml. Des bilans biochimiques ont été réalisés hebdomadairement afin de contrôler les fonctions rénales et hépatiques. Les chiens ont été soumis à un examen clinique quotidien.

# II.2.7.3. Transplantation cellulaire

Les cellules transduites par le rétrovirus *nls-LacZ* ont été trypsinées et remises en suspension dans une solution saline (Hank's Balanced Salt Solution, HBSS, Invitrogen, Carlsbad, CA). La concentration de la suspension cellulaire a été obtenue par dénombrement des cellules vivantes à la cellule de Malassez après coloration au bleu trypan (0,4%). 2.10<sup>6</sup> cellules ont été mises en suspension dans 250 µl de HBSS.

L'intervention chirurgicale s'est déroulée sous anesthésie générale induite par une injection intraveineuse associant kétamine (8 mg/kg) et xylazine (0,1 mg/kg), relayée par de l'halothane à 1% administré par intubation endotrachéale. Chaque chien dystrophinopathe (n=2) âgé de trois mois a reçu des injections intramusculaires pratiquées dans le *gluteus* superficiel, le triceps brachial et le muscle semi-tendineux. Les muscles ont été exposés après dissection chirurgicale. Les injections ont été réalisées à l'aide de seringues Hamilton montées sur une pompe à injection réglée sur un débit équivalent à 80 µl/min. Les LAC ont été injectés dans les muscles des membres gauches. Les EAC sont injectés dans les muscles droits.

# II.2.8. Exploration des muscles dystrophiques injectés

La révélation de la présence de noyaux  $\beta$ -gal-positifs au sein du tissu receveur a permis de déterminer la distribution des cellules greffées dans le tissu musculaire. De plus, l'efficacité des EAC et des LAC en terme de participation à la myogenèse et de rétablissement de la dystrophine a pu être évaluée par la réalisation de marquages immunohistochimiques.

#### II.2.8.1. Prélèvements musculaires

Les chiens ayant reçu la greffe cellulaire ont été sacrifiés quatre semaines après l'intervention chirurgicale. Immédiatement après l'euthanasie, les muscles ont été prélevés et séparés en deux parties : l'une destinée à la révélation enzymologique de l'activité  $\beta$ -galactosidase nucléaire ( $\beta$ -gal), l'autre destinée aux analyses immunohistochimiques.

# II.2.8.2. Analyse des noyaux $\beta$ -gal-positifs au sein du tissu musculaire

La partie du prélèvement destinée à la révélation enzymologique de l'activité β-galactosidase nucléaire a été traitée selon une méthode *in toto* (Kinoshita et al., 1994). Les prélèvements ont été ensuite inclus en paraffine (Thermo Shandon). Pour chaque muscle, 350 sections transversales de 8 μm d'épaisseur ont été réalisées et contrecolorées au Kernechtrot afin de déterminer la distribution des noyaux β-gal-positifs. Plus de 200 fibres musculaires chimériques contenant au moins un noyau β-gal-positif ont été dénombrées dans chaque muscle. Sur chaque section, le nombre et la localisation dans le tissu musculaire des noyaux β-gal-positifs ont été déterminés. Les noyaux β-gal-positifs ont été localisés au sein des fibres musculaires (position centronucléée et périphérique), en position satellite (entre le sarcolemme et la membrane basale) et au sein du tissu conjonctif.

# II.2.8.3. Immunohistochimie réalisées sur coupes congelées

Les prélèvements destinés aux analyses immunohistochimiques ont été refroidis trente secondes dans l'isopentane plongés dans l'azote liquide et conservés à -80°C avant d'être coupés au cryostat en coupes sériées de 8 μm. La présence de cellules greffées a été révélée par l'utilisation d'un anticorps polyclonal de lapin (AB1211, Chemicon) reconnaissant la β-galactosidase nucléaire.

#### Co-marquages; $\beta$ -gal, laminine et dystrophine

Des immunomarquages ont pour objectif de déterminer si les cellules greffées étaient capables de donner naissance à des cellules satellites, définies par leur position entre le sarcolemme et la membrane basale. Les co-marquages ont été réalisés à l'aide des anticorps suivants : Laminine (L9393, Sigma, dilué au 1/125) pour le marquage de la membrane basale ; dystrophine (NCL – DYS2, dilué au 1/50, Novocastra Laboratories) pour le marquage de la membrane plasmique. Des marquages Pax-7 (PAX-7, DSHB, dilué au 1/10) ont été réalisés pour tester leur expression de Pax-7 nucléaire.

#### Immunomarquages dystrophine, utrophine et $\beta$ -dystroglycane

Ces immunomarquages ont eu pour but de montrer que la présence des LAC s'associait à des modifications de l'expression de la dystrophine, de l'utrophine et du β-dystroglycane. Les comarquages ont été réalisés à l'aide des anticorps monoclonaux de souris (Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK) suivants : dystrophine (NCL – DYS2, dilué au 1/50), utrophine (NCL – DRP2, dilué au 1/8) et β-dystroglycane (NCL – β-DG, dilué au 1/100). Les immunomarquages ont été révélés par l'utilisation d'anticorps secondaires couplés à des fluorochromes : anticorps antisouris Alexa Fluor-488 et anticorps anti-lapin Alexa Fluor-488 (Molecular Probes, Eugene, OR, dilué au 1/100). Les lames ont été montés avec un milieu contenant un colorant nucléaire (Vectashield with DAPI ; Vector Laboratories; Burlingame, CA). Les lames ont été observées à l'aide d'un microscope confocal Nikon C1 inversé ECLIPSE TE 2000E à focus motorisé et équipé de lasers émettant à 488 nm et à 543 nm.

# II.3. Résultats

#### II.3.1. Isolement de LAC chez le chien

Nous avons adapté chez le chien la technique d'ensemencements successifs, à partir de MDC extraites des muscles périphériques de chien Golden Retriever sains âgés de 4 semaines. Nous avons montré que les MDC canines présentent des capacités d'adhérence variables. La population initiale de MDC a été séparée, de façon reproductible (n=5), en 5 sous-populations (Tab.13). Nous avons classé ainsi les cellules en 4 catégories :

Cellules AC0 : cellules ayant adhéré dans la 1<sup>e</sup> heure de culture. Cette population représente 36,5±16,5%. Il s'agit d'un mélange de fibroblastes et de myoblastes.

Cellules AC1 et AC2 : Cellules à adhérence immédiate : les EAC (*Early Adherent Cells*). Ces cellules ont adhéré au support dans les 48 heures qui suivent leur mise en culture. Cette population représente à elle seule 55,8% de la population extraite. AC1 et AC2 constituent respectivement 43,3±6,5% et 12,5±6,0% de la population de MDC initiales.

Cellules AC3 : Cellules à adhérence intermédiaire. Elles représentent 4,8±4,5% de la population initiale de MDC. Elles adhérent au support en plus de 48 heures.

Cellules AC4 : Cellules à adhérence retardée : les LAC (*Late Adherent Cells*). Ces cellules sont isolées après plus de 72 heures de culture. Il s'agit d'une fraction marginale représentant 2,9±2,5% de la population initiale.

Pourcentage de la					
Adherent Cells (AC)	population totale de MDC		Pourcentage cumu		
	Moyenne	Ecart-type			
AC0	36,5%	16,5%	36,5%		
AC1	43,3%	6,5%	79,8%		
AC2	12,5%	6,0%	92,3%		
AC3	4,8%	4,5%	97,1%		
AC4 = LAC	2,9%	2,5%	100%		

Tableau 13: Proportion des Adherent Cells

La technique d'ensemencements successifs, permettant de séparer la population initiale de MDC. AC0 correspondent aux cellules ayant adhéré dans la première heure de mise en culture. Les cellules AC1, AC2 et AC3 sont des cellules se fixant au support après 24h, 48h et 72h respectivement. Les AC4, ou MDSC pour *Muscle Derived Stem Cells*, sont les cellules qui ont besoin de plus de 72 heures pour adhérer.

# II.3.2. Phénotype des LAC

Le phénotype des EAC et des LAC a été déterminé par cytométrie en flux ou immunocytochimie sur cellules déposées en cytospin, afin d'évaluer le contenu cellulaire des 2 populations isolées par la technique d'ensemencement successifs. Les résultats sont rapportés dans le Tableau 14.

			EAC	LAC
Marqueurs myogéniques	c-Met	lmm	86,3±5,7%	76,6±2,1%
	M-cadherine	lmm	90,3±1,7%	73,9±2,4%
	Pax7	lmm	66,9±3,9%	45,6±4,5%
	MyoD	lmm	65,9±0,9%	49,3±2,5%
	Vimentine	lmm	50,3±0,9%	16,6±4,6%
	Desmine	lmm	34,9±0,6%	16,3±2,6%
Marqueurs de cellules souches hématopoïétiques	CD45	Flow	<1%	<1%
	CD34	Flow	33,4±4,1%	28,4±3,6%
	c-kit	Flow	<1%	<1%
	ABCG2	Flow	<1%	<1%
	MDR	Flow	<1%	<1%
	Flk1	Flow	<1%	<1%
Marqueurs lymphoïdes	B-marker F	Flow	<1%	<1%
	CD4	Flow	<1%	<1%
	CD5	Flow	<1%	<1%
	CD8	Flow	<1%	<1%
Marqueurs myéloïdes	CD11a	Flow	<1%	<1%
	CD11b	Flow	<1%	<1%
	CD18	Flow	<1%	<1%
	CD14	Flow	<1%	<1%
Marqueurs endothéliaux	CD31	lmm	6,3±2,6%	1,9±0,9%
Molécules d'adhérence	CD62-L	Flow	<1%	<1%

# Tableau 14 : Phénotype des EAC et des LAC

Le phénotype des EAC et des LAC a été déterminé par cytométrie en flux (*Flow*) ou immunocytochimie sur cytospin (*Imm*). Les résultats sont présentés sous la forme de moyennes et d'écart-types obtenus à partir d'expériences indépendantes.

# II.3.2.1. Marqueurs myogéniques

Le pourcentage de EAC M-cadhérine<sup>+</sup> ou c-Met<sup>+</sup> est de  $90,3\pm1,7\%$  et  $86,3\pm5,7\%$  respectivement, ce qui montre que les cellules ayant adhéré rapidement au support sont des cellules musculaires.  $66,9\pm3,9\%$  des EAC sont Pax7<sup>+</sup> et  $65,9\pm0,9\%$  sont MyoD<sup>+</sup>. Les EAC sont des cellules engagées dans la lignée myogénique et en cours de prolifération. La proportion de cellules exprimant la desmine  $(34,9\pm0,6\%)$  indique que certaines cellules EAC sont en cours de différenciation terminale (Fig.25).

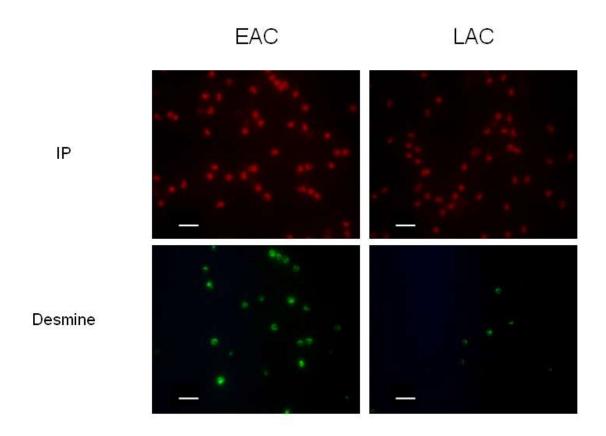


Figure 25 : Immunomarquages des EAC et des MDSC sur cytospins

La proportion de cellules exprimant la desmine (34,9 $\pm$ 0,6%) indique que certaines cellules EAC sont en cours de différenciation terminale alors que pour les LAC, le niveau d'expression de la desmine (16,3 $\pm$ 2,6%) est plus faible. IP : lodure propidium. Barre = 10  $\mu$ m.

En ce qui concerne les LAC, 76,6±2,1% des cellules sont M-cadhérine<sup>+</sup> et positives et 73,9±2,4% c-Met<sup>+</sup>. Les LAC expriment précocement des marqueurs myogéniques membranaires, tels que c-Met et M-cadhérine, ce qui confirme leur nature musculaire. Cependant, cette proportion est moins élevée que celle observée en EAC. Les niveaux d'expression de myoD (49,3±2,5%), de Pax7 (45,6±4,5%) et de desmine (16,3±2,6%) sont plus faibles.

# II.3.2.2. Marqueurs de cellules souches hématopoïétiques

La technique d'extraction des MDC permet d'obtenir une suspension enrichie en cellules musculaires, mais qui contient également des fibroblastes, des cellules endothéliales voire des cellules immunitaires et des cellules hématopoïétiques. Dans ce contexte, nous avons cherché à déterminer si les LAC pouvaient correspondre à des cellules souches hématopoïétiques circulantes.

Dans le muscle adulte, les cellules satellites quiescentes expriment le CD34 (Beauchamp et al., 2000). Cependant, le CD34 n'est pas un marqueur exclusif des cellules satellites étant donné qu'il peut être exprimé par les cellules endothéliales et certaines cellules souches, hématopoïétiques notamment. Les EAC et les LAC expriment en proportion variable le CD34 : 33,4±4,1% des EAC et 28,4±3,6% des LAC sont CD34<sup>+</sup>.

La négativité obtenue pour le CD45, le c-kit, le Flk-1 et pour les marqueurs lymphoïdes et myéloïdes indique clairement que nos cellules ne sont pas d'origine hématopoïétique. Elles ne correspondent donc pas à des cellules souches hématopoïétiques ou des cellules immunitaires circulantes.

Enfin, nous avons voulu comparer les LAC aux cellules de la mSP en testant nos cellules pour l'expression des principales pompes responsables de l'exclusion du Hoeschst 33342. Nos cellules n'expriment pas de pompes type MDR1 ou ABCG2. Les LAC ne correspondent donc pas aux cellules mSP.

# II.3.2.3. Marqueurs de cellules endothéliales et molécules d'adhérence

La proportion de cellules exprimant le CD31 est négligeable à la fois dans les EAC et les LAC: nos cellules ne sont donc pas d'origine endothéliale. De plus, les LAC n'expriment pas de molécules d'adhérence comme la L-sélectine (CD62-L).

# II.3.3. Comportement in vitro des LAC

#### II.3.3.1. Prolifération

La culture clonale permet d'appréhender le comportement individuel des cellules sélectionnées. L'obtention de clones, par la méthode de dilution limite, nous a permis de démontrer que les LAC ont un pouvoir prolifératif plus élevé que les EAC (Tab.15).

92 clones et 57 clones ont été dénombrés pour les EAC et les LAC respectivement. 11 jours après l'ensemencement, le nombre de noyaux dans chaque clone est compté. La taille moyenne des clones de EAC est inférieure à celle des LAC. Les LAC forment des clones comprenant 210±6 noyaux alors que les MDSC contiennent 329±11 noyaux.

	Nombre de clones musculaires	Taille moyenne	
EAC	92	223±6	
LAC	57	329±11	

Tableau 15 : Capacité de prolifération des EAC et des LAC en cultures clonales

Les EAC et les LAC ont été ensemencées en cultures clonales par dilution limite. Après 11 jours, la taille des clones, c'est-à-dire le nombre de noyaux contenus dans un clone, est déterminé après confirmation de leur origine musculaire.

Nous avons alloté les clones en fonction de leur taille et trois groupes ont été définis (Fig.26) :

Les clones faiblement prolifératifs possédant au maximum 128 noyaux. Ces clones sont autant représentés dans les EAC (27,7±0,9%) que les LAC (27,6±1,8%).

Les clones moyennement prolifératifs dont la taille est comprise entre 128 et 256 noyaux. La proportion de tels clones est  $53.2\pm1.5\%$  pour les EAC et de  $27.6\pm0.7\%$  pour les LAC (p < 0.05).

Les clones fortement prolifératifs possédant plus de 256 noyaux, représentant  $19,1\pm0,6\%$  des clones de EAC versus  $44,8\pm1,1\%$  pour les LAC. Ainsi, environ une LAC sur deux possède un pouvoir prolifératif élevé (p < 0,05).

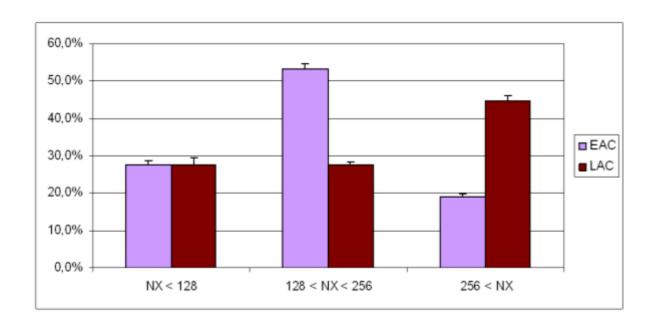


Figure 26 : Répartition de la taille des clones obtenus à partir des EAC et des LAC.

Les clones sont alors répartis en trois groupes en fonction de leur taille : (1) les clones faiblement prolifératifs possédant au maximum 128 noyaux ; (2) les clones moyennement prolifératifs dont la taille est comprise entre 128 et 256 noyaux et (3) les clones fortement prolifératifs possédant plus de 256 noyaux. 53,2±1,5% des clones issus des EAC sont des clones moyennement prolifératifs alors 44,8±1,1% des clones de LAC sont des clones fortement prolifératifs.

#### II.3.3.2. Différenciation

Les LAC canines présentent *in vitro* des caractéristiques de précurseurs musculaires. Ces cellules se caractérisent en culture par une quiescence initiale de 7 jours en culture primaire où elles évoluent en colonies microsphéroïdes de cellules rondes, mononucléées et par une différenciation myogénique retardée de 7 jours par rapport aux myoblastes, descendants des cellules satellites musculaires.

Dans les cultures obtenues à partir des EAC, au bout de 24-48 heures, les cellules de forme ovoïde sont fixées au fond de la boîte et s'étalent (Fig.27). Elles deviennent alors fusiformes. Elles développent des prolongements cytoplasmiques. À partir de J4-J5, des cellules plurinucléées contenant 2-3 noyaux sont observées. Elles résultent de la fusion de cellules entre elles et évoluent vers la forme myotube, cellule plurinucléée rubannée, en 2-3 jours. Un autre aspect morphologique est observé : des cellules plurinucléées, de forme ovoïde, étalées et pourvues de nombreux noyaux ont été appelées syncytium pour les différencier des myotubes, qui présentent une morphologie tubulaire proche de celle d'une fibre. A J7-J8, on observe des myotubes épais contenant plusieurs

centaines de noyaux dispersés dans le cytoplasme. Progressivement les myotubes se rétractent et se décollent. À partir de J8, la proportion de débris cellulaires augmente, la culture montre des signes de dégénérescence (vacuolisation).

Dans les cultures obtenues à partir des LAC, la morphologie et l'évolution des cellules sont particulières. Pendant les vingt-quatre heures après que la mise en culture des cellules, le milieu contient de nombreux débris cellulaires. Cependant, l'examen minutieux révèle la présence de petites cellules rondes adhérent faiblement au support. Pendant environ 5 jours, les cellules apparaissent rondes, fortement réfringentes, de petite taille, avec un faible volume de cytoplasme. A ce stade, elles sont la particularité de former des groupes de 4-5 cellules formant des structures microsphéroïdes ou « myosphères ». Dans les jours suivants, ces myosphères continuent de se développer en taille et en nombre de cellules, mêlant à la fois des cellules rondes et des cellules fusiformes. Environ 7 jours après ensemencement, la culture commence à évoluer. Les cellules s'étalent, prolifèrent et suivent les étapes morphologiques classiques d'une culture de myoblastes. A J12, on observe des myotubes grêles.

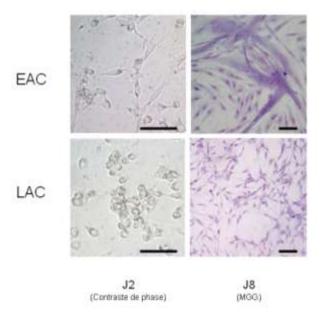


Figure 27 : Evolution morphologique des EAC et des LAC

Dans les cultures obtenues à partir des EAC, les cellules s'étalent au bout de 48 heures et sont fusiformes. La fusion de cellules entre elles résulte en la formation de myotubes épais contenant plusieurs centaines de noyaux dispersés dans le cytoplasme facilement observables à J8.

Les LAC se caractérisent en culture par : une quiescence initiale de 7 jours en culture primaire où elles évoluent en colonies microsphéroïdes de cellules rondes, mononucléées et une différenciation myogénique retardée de 7-8 jours par rapport aux EAC. En effet, ce n'est qu'à J8 que les MDSC s'étalent pour devenir fusiformes.

### II.3.3.3. Plasticité

Le potentiel des LAC à se différencier en différents types cellulaires a été exploré de façon à compléter leur définition de progéniteurs immatures à caractère souche. Pour cela, les LAC ont été placés en culture primaire en présence de milieux d'induction spécifiques d'adipocytes et d'ostéoblastes (Fig.28).

### Potentiel de différenciation Analyse RT-PCR Adipogénique PPAR<sub>7</sub> LPL ADIPOQ D0 D14 D0 D14 D0 D14 Culture primaire de LAC en milieu d'induction pendant 14 jours Induction d'ARNm d'adipocytes Formation de gouttelettes lipidiques Phosphatase alcaline Von Kossa Rouge alizarine Ostéogénique D0 Culture primaire de LAC en milieu d'induction D21 pendant 21 jours Induction d'une Dépôts de minéralisation phosphatase alcaline

Figure 28 : Potentiel de différenciation des LAC

Les LAC ont été placés en culture primaire en présence de milieu d'induction spécifique d'adipocytes et d'ostéoblastes. Après 14 jours, la présence de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des cellules mises en évidence par une coloration Red oil indique la différenciation adipogénique des LAC. Cette orientation adipogénique a été confirmée par RT-PCR avec une induction d'ARNm spécifiques d'adipocytes comme le PPARy, la lipoprotéine lipase (LPL) et l'adiponectine. Après 21 jours, l'induction d'une phosphatase alcaline et la mise en évidence de dépôts de minéralisation par des colorations Von Kossa et rouge alizarine révèle une différenciation ostéogénique.

#### Différenciation adipogénique

Les cellules ont été cultivées dans un milieu d'induction adipogénique pendant plus de 14 jours. Ces cellules ont été comparées à des cellules mises en milieu de prolifération.

Après 14 jours, nous avons pu mettre en évidence leur capacité à se différencier en adipocytes, objectivée par la présence dans les cultures de grandes cellules rondes mononucléées contenant de nombreuses gouttelettes lipidiques *red oil* positive dans leur cytoplasme. Cette orientation adipogénique a également été confirmée par RT-PCR avec une induction d'ARNm spécifiques d'adipocytes comme le PPARy, la lipoprotéine lipase et l'adiponectine.

#### Différenciation ostéogénique

Les cellules ont été cultivées dans un milieu d'induction ostéogénique pendant plus de 21 jours. Ces cellules sont comparées à des cellules mises en milieu de prolifération.

Dans les 3-4 premiers jours, des différences morphologiques sont observées. Les cellules placées en milieu de prolifération commencent à fusionner pour former des myotubes alors que les cellules placées en milieu ostéogénique restent mononucléées et rondes. Lorsque la culture est arrivée à 90% de confluence, on observe une hypertrophie de ces cellules.

Les cellules hypertrophiées expriment la phosphatase alcaline, témoin biochimique de l'activité ostéoblastique (Katagiri et al., 1995). De plus, la différenciation en ostéoblastes est associée à un dépôt de minéralisation, mis en évidence par des colorations Von Kossa et rouge d'alizarine

Ces deux résultats révèlent l'existence d'une plasticité *in vitro* des LAC. Comme chez la souris, ces cellules sont capables de se différencier en d'autres types cellulaires. Les LAC correspondent donc aux MDSC (*Muscle Derived Stem Cells*) et nous les dénommerons ainsi dans la suite de ce travail.

# II.3.4. Evaluation de l'efficacité en transplantation des MDSC

# II.3.4.1. Survie post-injection

Le repérage des cellules greffées dans le tissu musculaire a été réalisé grâce à la révélation de l'activité  $\beta$ -galactosidase nucléaire (Fig.29). Aucun noyau  $\beta$ -gal-positif n'a été observé dans les muscles injectés avec les EAC, traduisant une absence de survie de ces cellules. En revanche, nous avons détecté 2540 à 3205 noyaux  $\beta$ -gal par muscle ayant reçu les injections de MDSC (Tab.16). Dans les mêmes conditions d'injection la survie des deux populations cellulaires est différente en milieu tissulaire pathologique : nulle pour les EAC, plus importante pour les MDSC.

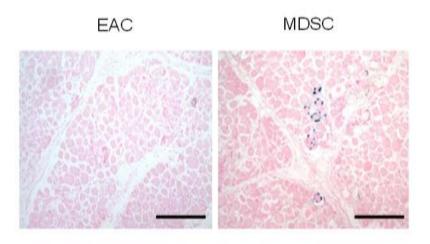


Figure 29 : Mise en évidence de la présence de noyaux  $\beta$ -gal-positifs au sein des muscles ayant reçu des injections de EAC et de MDSC

Le repérage des cellules greffées dans le tissu musculaire se fait grâce à la révélation de l'activité  $\beta$ -galactosidase nucléaire. Alors que de nombreux noyaux sont repérés dans les muscles ayant reçu des injections de MDSC, aucun noyaux de EAC n'est retrouvé. Barre = 200  $\mu$ m

		Nombre de noyaux		Localisation	n des noyaux	ux β-gal-positifs		
Muscle	Population		Intrafibre			Satellite I	Interstitielle	
		β-gal-positifs	Total	Périphérique	Centrale	. Satellite	mersudene	
Chien 1 : Attila								
	EAC	0	-	-	-	-	-	
Gluteus superficiel	MDSC	3205	65%	43%	12%	35%	10%	
	EAC	0		-				
Triceps brachial	MDSC	2999	60%	48%	12%	29%	11%	
	EAC	0						
Semi-tendineux	MDSC	2540	64%	53%	11%	25%	11%	
Older O. Buldala								
Chien 2 : Babiole	EAC	0						
Gluteus superficiel	MDSC	110	50%	- 47%	3%	30%	20%	
Triceps brachial	EAC	0	-	-	-	-	-	
Thoops brasman	MDSC	98	59%	57%	2%	25%	16%	

Tableau 16 : Dénombrement et localisation des noyaux  $\beta$ -gal-positifs dans les muscles ayant reçu des injections de EAC et de MDSC

### 1.3.4.2. Fusion

Les noyaux des MDSC ont été identifiés au sein des fibres musculaires (position centronucléée et périphérique), en position satellite (entre le sarcolemme et la membrane basale) et au sein du tissu conjonctif (perimysium et endomysium) (Tab.16 et Fig.30). Ils sont très majoritairement localisés au sein des fibres musculaires. 50 à 65% des noyaux β-gal-positifs sont retrouvées dans les myofibres, suggérant que les MDSC fusionnent efficacement pour former de nouvelles fibres. L'analyse indique que 43 à 53% des noyaux se positionnent sous le sarcolemme, position périphérique classique des noyaux des fibres musculaires squelettiques. 11-12% des noyaux sont au centre de la fibre (centronucléation) dans le chien n°1, ce qui n'est pas observé dans le chien n°2

(2%). Enfin, nous observons que 10 à 18% des noyaux sont présents dans le perimysium ou l'endomysium.

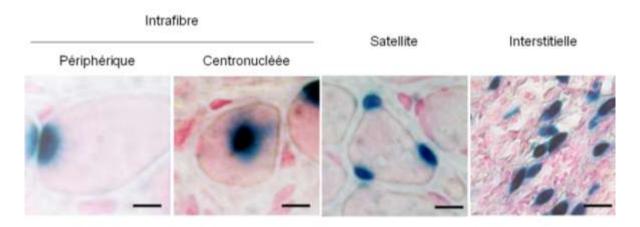


Figure 30 : Localisation des noyaux MDSC β-gal-positifs

L'analyse de la distribution des noyaux  $\beta$ -gal-positifs au sein du tissu receveur permet d'étudier le comportement des cellules greffées. Sur des sections transversales, la révélation de l'activité  $\beta$ -galactosidase a été réalisée et les lames sont contrecolorées au Kernechtrot afin de déterminer la distribution des noyaux  $\beta$ -gal-positifs. Les noyaux ont été recherchés dans la fibre musculaire (position centronucléée et périphérique), en position satellite (entre le sarcolemme et la membrane basale) et au sein du tissu conjonctif. Barre = 10  $\mu$ m

#### II.3.4.3. Genèse de cellules satellites

L'analyse des sections transversales indique que 25 à 35% des noyaux MDSC  $\beta$ -gal-positifs sont positionnés dans la niche satellite (Tab.16). Cette position, entre le sarcolemme et sous la membrane basale, est mise en évidence par une co-localisation avec la dystrophine et la laminine (Fig.31). L'expression de pax-7 dans certains de ces noyaux  $\beta$ -gal-positifs en position satellite de la fibre musculaire confirme que les MDSC fournissent des cellules satellites (Fig.32).

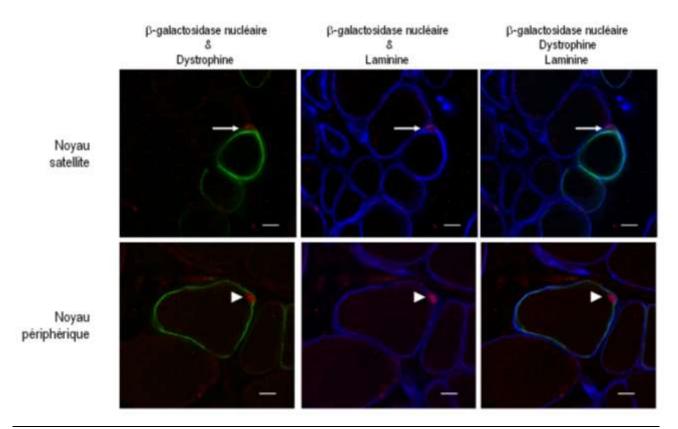


Figure 31 : Localisation en position satellite et périphérique des noyaux MDSC

Le sarcolemme est mis en évidence par l'expression de la dystrophine (vert). La lame basale est révélée par immunomarquage de la laminine (bleu). En position satellite (flèche), le noyau MDSC, identifié par son activité  $\beta$ -galactosidase nucléaire (rouge) est localisé entre le sarcolemme et la lame basale alors qu'en position périphérique (pointe de flèche), le noyau se trouve sous le sarcolemme. Barre = 10  $\mu$ m

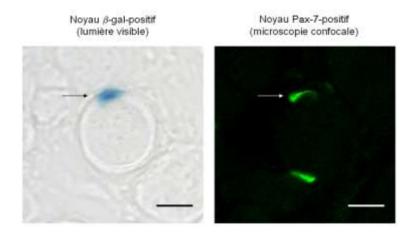


Figure 32 : Co-localisation de l'activité  $\beta$ -galactosidase nucléaire des MDSC et de l'expression de Pax-7

Le noyau MDSC, repéré par son activité  $\beta$ -galactosidase nucléaire (bleu) en lumière visible est localisé entre le sarcolemme et la lame basale. Ce noyau exprime Pax7 (Vert) observé par immunofluorescence. Barre = 10  $\mu$ m

# II.3.4.4. Restauration de la dystrophine et expression d'utrophine et de $\beta$ -dystroglycane

Par microscopie confocale, nous avons montré que la localisation de la β-galactosidase nucléaire des MDSC est associée à une expression membranaire de la dystrophine. Ce résultat est similaire pour les fibres aux noyaux MDSC β-gal-positif périphérique et pour les fibres centronucléées. En conséquence de la présence des MDSC au sein des fibres musculaires, une restauration de la dystrophine est observée dans un nombre intéressant de fibres musculaires, oscillant entre 5 et 14% des fibres comptées au site d'injection (Tab.17 & Fig.33).

D'autre part, la présence des MDSC au sein des fibres est corrélée avec une disparition de l'expression membranaire de l'utrophine ainsi qu'avec une augmentation de l'expression du β-dystroglycane (β-DG), une des protéines du complexe associé à la dystrophine (Fig.33).

Muscle	Condition	Nombre total de fibres	Fibres dystrophine positive		
Gluteus superficiel	EAC	1301	0%		
	MDSC	1941	5%		
Triceps brachial	EAC	1166	0%		
	MDSC	6579	14%		

Tableau 17 : Dénombrement du nombre de fibres dystrophine-positives dans les muscles ayant reçu des injections de EAC et de MDSC

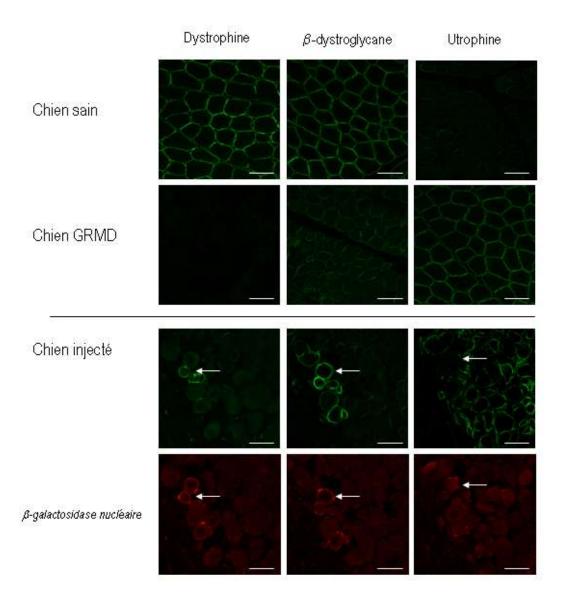


Figure 33 : Expression de la dystrophine, du  $\beta$ -dystroglycane et de l'utrophine dans un muscle de chien sain, de chien dystrophinopathe et dans un muscle ayant reçu des injections de MDSC

Chez le chien GRMD, la dystrophine est complément absente, le  $\beta$ -dystroglycane est faiblement présent au niveau du sarcolemme et l'utrophine est surexprimée. Les fibres ayant incorporé un noyau MDSC expriment la dystrophine ; Barre = 50  $\mu$ m

\*\*\*

Ainsi, nous avons repris et adapté la technique de « preplating » chez le chien. Son usage a permis d'isoler une population de cellules à adhérence immédiate, les EAC et une population à adhérence retardée, les LAC. Alors que les EAC se comportent comme des myoblastes, les LAC canines présentent des similarités avec la population de MDSC décrite chez la souris. Il s'agit en effet d'une fraction cellulaire marginale des MDC présentant in vitro des capacités de prolifération élevées, une évolution en myosphères et une plasticité confirmée dans les lignées adipogénique et ostéoblastique. Les LAC peuvent donc être considérées comme des MDSC.

Nos résultats obtenus in vivo montrent que dans des conditions pathologiques, les MDSC survivent à la transplantation musculaire contrairement aux EAC. Les MDSC participent efficacement à la régénération musculaire et génèrent des cellules satellites. L'incorporation de noyaux MDSC au sein de fibres musculaires s'accompagne d'une restauration de la dystrophine membranaire.

## III. Discussion générale

Le muscle squelettique adulte, bien que différencié conserve une remarquable capacité de régénération qui est attribuée aux cellules satellites. L'utilisation de ces cellules et de leurs descendants in vitro, les myoblastes, pour corriger le défaut génétique de patients atteints de Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est une voie thérapeutique qui fait l'objet de recherche depuis de nombreuses années. En effet, la thérapie cellulaire représente une approche intéressante pour le traitement de la DMD, car elle permet de créer un réservoir de cellules capables de fusionner avec les fibres et de restituer la dystrophine. Cependant, la greffe de myoblastes montre des limites importantes, induites principalement par la faible survie des cellules post-injection (Beauchamp et al., 1999), l'induction d'une forte réaction inflammatoire (Guerette et al., 1997a), la faible capacité de migration dans le tissu musculaire (Huard et al., 1994b; Satoh et al., 1993) et l'inefficacité à traverser la paroi vasculaire, rendant l'administration systémique des myoblastes par voie intra-veineuse ou intraartérielle inexploitable. Depuis la fin des années 90, de nombreux travaux ont démontré un potentiel myogénique pour des cellules souches adultes extraites ou non du tissu musculaire. Les essais de transplantation de ces cellules ont montré une efficacité bien supérieure aux greffes de myoblastes (Peault et al., 2007; Urish et al., 2005). Ces résultats ont confirmé la nécessité d'une sélection de progéniteurs à potentiel myogénique d'intérêt et c'est dans ce contexte que se sont inscrits mes travaux de thèse.

L'objectif général de ces travaux a été d'isoler les MDSC (*Muscle-Derived Stem Cells*) dans un modèle gros animal, cliniquement relevant, c'est-à-dire chez le chien GRMD (*Golden Retriever Muscular Dystrophy*), modèle le plus proche de l'enfant dystrophinopathe. Nous avons pour cela adapté une méthode d'isolement de cellules souches adultes, jusqu'alors décrite que chez la souris par le seul groupe de Huard : la technique de « preplating ». Cette démarche expérimentale permet de trier les cellules dérivées du muscle (MDC) selon leur capacité d'adhérence (Huard et al., 2003; Qu-Petersen et al., 2002).

Dans une première étude, nous avons utilisé un modèle aviaire afin de valider notre protocole expérimental. Ce modèle, maîtrisé dans le laboratoire, présente l'avantage d'associer les

caractéristiques d'un animal de grande taille à une grande disponibilité en animaux d'expérimentation, contrairement au modèle canin. En utilisant la technique de « preplating », nous avons montré que les MDC sont caractérisées par une grande diversité dans leur capacité à adhérer, ce qui nous a permis d'identifier une fraction marginale présentant un défaut initial d'adhérence, correspondant à 1% des MDC. Des investigations méthodologiques ont révélé pour la première fois d'une part que ce défaut ne peut être attribué à la méthodologie employée et d'autre part que ces cellules ne sont pas générées in vitro par les myoblastes. Les cellules à adhérence retardée (LAC) constituent donc une population résidente dans le muscle. In vitro, les LAC ont été caractérisées par des modalités de prolifération atypiques avec la formation de microsphéroïdes et une faible capacité de fusion. Par analyse morphométrique, nous avons démontré que les LAC sont majoritairement des cellules rondes et de petite taille, 73% d'entre elles mesurant moins de 6,5 µm. Une évaluation phénotypique a montré que les LAC correspondent à des progéniteurs immatures ou à des cellules myogéniques aux stades précoces du programme myogénique. Collectivement, ces résultats ont permis de montrer que l'adhérence est un caractère universel pouvant être utilisé pour séparer les progéniteurs des cellules engagées dans le programme myogénique. En effet, cette méthode repose sur un critère de sélection purement fonctionnel, permettant de s'affranchir de l'utilisation de marqueurs et est donc transposable et adaptable à tout modèle animal.

Forts de ces résultats, nous nous sommes focalisés sur l'isolement de LAC dans un modèle canin afin de les utiliser par la suite en thérapie cellulaire chez le chien GRMD. À l'issue de ce travail, le terme de MDSC a été attribué aux LAC canines en raison de leurs propriétés biologiques communes avec les MDSC murines : des caractéristiques comportementales de cellules quiescentes, une forte capacité de prolifération, une faible capacité de fusion in vitro, un phénotype de cellules peu engagées dans la voie myogénique et une capacité de multipotence traduite par une différenciation en adipocytes et ostéoblastes in vitro après mise en contact avec des facteurs d'induction spécifiques de ces deux types cellulaires. Enfin, dans un muscle de chien GRMD, c'està-dire dans un contexte pathologique, l'injection intramusculaire de MDSC présente une efficacité très supérieure à l'injection de myoblastes. En effet, les MDSC ont une capacité de survie significativement supérieure et sont observées après 4 semaines dans le tissu musculaire. 60% des MDSC ont fusionné avec des fibres musculaires tandis que 10% présentent une localisation conjonctive. Leur participation à la formation de fibres musculaires s'accompagne d'une restauration de la dystrophine mais également du β-dystroglycane, une protéine du complexe associé à la dystrophine. Enfin, 30% des MDSC présentent une localisation en position satellite, mimant par là la situation physiologique.

Il est intéressant d'analyser l'évolution du concept de cellules « satellites » au cours des deux dernières décennies. Entre 1961 et 1990, il était communément admis que les cellules responsables de la régénération du tissu musculaire squelettique étaient les cellules satellites. Elles sont immédiatement activées en cas de lésion traumatique ou pathologique, et représentent un moyen de réponse à ces traumatismes très rapide et très efficace, dans la mesure où elles sont déjà déterminées sur le plan du programme myogénique. Cependant, ces cellules sont apparues comme capables d'adopter différents comportements à la fois *in vitro* et *in vivo*, indiquant qu'elles ne constituaient pas une population homogène de cellules myogéniques (Baroffio et al., 1996; Lagord et al., 1998; McFarland et al., 1993a; McFarland et al., 1995; Molnar et al., 1996; Rantanen et al., 1995; Rouger et al., 2004; Schultz, 1996; Schultz and Lipton, 1982). Cette notion d'hétérogénéité a été corroborée par la démonstration que les cellules en position satellite sont composées de précurseurs myogéniques cellules Pax7<sup>+</sup>/Myf5<sup>+</sup> mais également de cellules Pax7<sup>+</sup>/Myf5<sup>-</sup> qui peuvent, selon le mode de division, renouveler les cellules de réserve Pax7<sup>+</sup>/Myf5<sup>-</sup> et générer des précurseurs Pax7<sup>+</sup>/Myf5<sup>+</sup> (Conboy and Rando, 2002; Cossu and Tajbakhsh, 2007; Kuang et al., 2007; Shinin et al., 2006). Il est donc clairement apparu qu'il était plus juste de parler de cellules occupant la « niche satellite » que d'une population de cellules satellites (Collins, 2006).

Les différentes populations de cellules souches qui ont été identifiées successivement au cours de ces dernières années l'ont été, en règle générale, par une seule équipe à l'aide d'une technique d'isolement et des critères bien spécifiques. Malheureusement, la multiplicité des protocoles d'isolement, publiés avec peu de détails, rend finalement difficile tout recoupement entre les multiples populations et toute intégration des résultats accumulés sur les cellules souches. Une analyse critique des différentes populations de cellules souches à potentiel myogénique (mSP, MDSC, mésoangioblastes, CSM, péricytes et cellules myoépithéliales) permet malgré tout de mettre en évidence un ensemble de caractéristiques communes, notamment entre les MDSC et les mésoangioblastes. Ceci est particulièrement intéressant dans la mesure où l'injection intra-artérielle de mésoangioblastes chez le chien GRMD a montré des résultats étonnants avec plus de 70% de fibres dystrophine-positives dans tous les muscles explorés apportant une amélioration significative de la motricité chez certains chiens traités (Sampaolesi et al., 2006). Ces résultats font des mésoangioblastes les candidats actuels pour des essais de thérapie cellulaire de la DMD.

De façon importante par rapport à la réalisation de mes travaux, les populations de mSP, de MDSC et de mésoangioblastes sont toutes présentées comme des cellules avec des difficultés d'adhérence. C'est d'ailleurs sur cette caractéristique fonctionnelle que repose l'isolement des MDSC murines (Qu-Petersen et al., 2002) ou des mésoangioblastes (Morosetti et al., 2007; Sampaolesi et al., 2006). Il est également rapporté que les cellules mSP in vitro restent rondes, mononucléées et non adhérentes dans les premiers jours de culture (Majka et al., 2003). Nous avons choisi de trier les MDC d'après leur capacité d'adhérence dans un modèle canin. Nous avons obtenu une sous-population de cellules présentant de nombreuses caractéristiques similaires à celles des MDSC murines, des cellules mSP et des mésoangioblastes : localisation intramusculaire, état de quiescence initiale, faible expression des marqueurs myogéniques précoces lors de l'isolement, fort potentiel d'expansion in vitro et capacité de multipotence. Comme les cellules mSP (Benchaouir et al., 2004), les MDSC représentent moins de 4% des MDC et sont majoritairement de petite taille (ces paramètres n'ont pas été décrits pour les mésoangioblastes). Du point de vue phénotypique, les MDSC partagent des points communs avec les mSP et les mésoangioblastes : ces cellules sont négatives pour le c-kit, le CD45, les marqueurs Lin et présentent une expression variable du CD34. Toutefois, les MDSC canines n'expriment pas de transporteurs ATP-dépendants de type ABC (gène ABCG2/BRCP1) ou MDR-1, suggérant qu'elles ne présentent pas d'activité d'efflux du colorant Hoeschst 33342 (Bunting, 2002; Zhou et al., 2001). Ce critère à l'origine de la définition des mSP n'est que très rarement utilisés pour définir les autres populations. Il n'a pas été utilisé pour caractériser les MDSC chez la souris et les mésoangioblastes que ce soit chez la souris ou le chien. D'autres propriétés biologiques sont partagées entre les mSP, MDSC et les mésoangioblastes. In vivo, elles sont capables de générer des cellules satellites. Cependant, un doute persiste sur l'origine endothéliale des MDSC. En effet, chez la souris uniquement, les MDSC sont positives pour le Flk-1, antigène membranaire commun aux cellules souches hématopoïétiques et endothéliales. Dans le muscle murin, elles sont juxtaposées aux capillaires et pourraient être assimilées aux péricytes (Qu-Petersen et al., 2002). Ces observations n'ont pas été confirmées dans notre modèle canin.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats tend vers l'idée qu'il n'existe pas différents types de cellules souches mais qu'il pourrait s'agir des mêmes cellules isolées par diverses approches et peut être prélevées à des niveaux d'engagement différents. Certaines études suggèrent qu'il existerait un *continuum* entre les cellules souches circulantes, les cellules interstitielles et les cellules de la « niche satellite » (Collins, 2006).

La sélection de progéniteurs par des approches reposant sur des critères fonctionnels nous semble présenter l'intérêt de pouvoir s'extraire des caractéristiques phénotypiques comme support de tri. Ceci apparaît fondamental dans le sens où la détermination d'une signature phénotypique est multiparamétrique. En effet, elle dépend des conditions d'isolement des cellules qui vont moduler largement et rapidement l'expression de marqueurs de surface notamment en fonction des enzymes utilisées (tant en termes de nature que de concentration ou encore de temps de contact avec la cellule), de leur conditionnement (cellules fraîchement extraites, cellules en prolifération ou en différenciation in vitro, cellules sur différentes matrices,..) ou encore de l'espèce animale considérée. À ce titre, nous pouvons donner l'exemple du Stem cell Antigen (Sca1), qui est largement utilisé pour définir les cellules souches hématopoïétiques, les différentes cellules souches du muscle (cellules mSP, MDSC, mésoangioblastes) et les progéniteurs endothéliaux, mais qui n'est connu que chez la souris (Domen et al., 2006). De la même façon, CD31, CD34, c-kit (De Angelis et al., 1999; Sampaolesi et al., 2003) sont exprimés par les mésoangioblastes chez la souris mais absents chez le chien (Sampaolesi et al., 2006) et chez l'Homme en dehors de CD31 et c-kit (Morosetti et al., 2006). Il est également clairement établi que l'expression du CD34 varie hautement suivant les études. Ainsi, les cellules CD34<sup>+</sup> peuvent représenter, au sein d'une même équipe, 100% (Lee et al., 2000) ou 30% des MDSC (Torrente et al., 2003), voire encore 80% des cellules mSP (Bachrach et al., 2004) ou aucune d'entre elles (Majka et al., 2003). L'adhérence cellulaire pourrait ainsi correspondre à un critère de choix pour la sélection de populations candidates à la thérapie. Cependant, les MDSC sont isolées par une méthodologie laissant les cellules en culture pendant plusieurs jours avant de les récolter avec des rendements faibles. Au sein du laboratoire, des travaux récents ont cherché à déterminer chez le chien si l'utilisation combinée de l'élutriation, permettant de sélectionner les cellules en fonction de leur taille, et du protocole de « preplating » pourrait permettre d'isoler de façon simplifiée des MDSC. A l'issue de l'élutriation, une fraction constituée de cellules de taille inférieure à 5,5 µm peut être isolée. Ces cellules sont à près de 99% situées en phase G<sub>0</sub>, autrement dit elles sont quiescentes. L'analyse des capacités d'adhérence des cellules de cette fraction selon un protocole de preplating simplifié a révélé que dès le 1<sup>e</sup> jour de culture, des cellules n'ayant pas adhéré au support peuvent être récupérées dans le surnageant de culture. Ces cellules correspondent à 3,5% des MDC, soit une proportion similaire à celle régulièrement décrite pour les MDSC. En culture, le suivi des modalités de prolifération de ces cellules indique de façon préliminaire un faible pouvoir prolifératif initial et la formation de « myosphères ». Le phénotype de ces cellules de même que leur potentiel de multipotence devront être déterminés avant de tirer des conclusions mais à la lumière de résultats

acquis, il semblerait que l'utilisation de l'élutriation puisse permettre d'isoler une fraction cellulaire enrichie en MDSC après 1 jour en culture seulement (*manuscrit en préparation*).

Un résultat important de notre travail est la démonstration de la capacité fonctionnelle des MDSC à participer à la génèse de fibres musculaires après la transplantation chez le chien GRMD. En effet, ce modèle animal développe la pathologie la plus proche de la DMD chez l'Homme, avec une évolution histologique semblable, notamment en ce qui concerne les lésions de phase II. Les souris mdx ne développent pas de fibrose, à l'exception du diaphragme. Le modèle murin ne reproduit que partiellement la physiopathologie observée chez les garçons atteints de DMD. L'intérêt scientifique de l'utilisation du chien GRMD dans les essais de thérapie cellulaire se retrouve donc renforcé.

Chez le chien GRMD, les MDSC ont une capacité de survie supérieure à celle des myoblastes et sont observées après 4 semaines dans le tissu musculaire. Les MDSC ont majoritairement fusionné avec des fibres musculaires. Des noyaux β-gal positifs sont observés au centre de la fibre (fibre centronucléée) ou à sa périphérie sous le sarcolemme. Ces résultats traduisent un comportement de fusion in vivo des MDSC similaire au comportement physiologique des « cellules satellites ». En réponse à une lésion musculaire, les cellules satellites activées se déplacent et se disposent le long de l'axe des fibres lésées où elles commencent à fusionner. Les fibres régénérées sont caractérisées par une basophilie du cytoplasme due à une augmentation de la densité cytoplasmique en ARN, par un diamètre inférieur à celui des fibres matures et par la position centrale de leurs noyaux. Au cours de la maturation de ces fibres, les noyaux migrent en périphérie (Hawke and Garry, 2001). L'observation à un instant donné de noyaux marqués en position centrale dans certaines fibres et en position périphérique dans d'autres permet de proposer l'hypothèse que les cellules injectées se sont incorporées à des temps différents entre le moment de l'injection et le moment du prélèvement. La durée de différenciation après fusion est constante, de l'ordre de trois semaines, sauf si certaines MDSC étaient à l'origine d'une différenciation moins rapide ou d'un blocage de cette différenciation, on peut penser qu'elles se sont incorporées à divers temps en fonction des stimulations locales. De plus, les MDSC sont capables de générer des cellules localisées en position satellite et exprimant variablement pax7. Ces résultats sont encourageants dans la mesure où la persistance à long terme du rétablissement de l'homéostasie musculaire dépend de la capacité de renouvellement in vivo des MDSC. Récemment, Kuang et al. (2007) ont révélé que les populations de cellules en position satellite exprimant Pax7 correspondent à des cellules renouvelant le pool de cellules de réserve et de cellules orientées dans la lignée myogénique. Ces deux populations sont obtenues suite à des divisions asymétriques orientées dans l'espace des cellules satellites Pax7<sup>+</sup>/Myf5<sup>-</sup> (Conboy and Rando, 2002; Cossu and Tajbakhsh, 2007; Kuang et al., 2007; Shinin et al., 2006). La division asymétrique d'une cellule Pax7<sup>+</sup>/Myf5<sup>-</sup> génère une cellule Pax7<sup>+</sup>/Myf5<sup>+</sup>, myogénique, en contact avec la fibre musculaire (position basale) et une cellule Pax7<sup>+</sup>/Myf5<sup>-</sup>, cellule de réserve, en contact avec la membrane basale (position apicale). Il serait donc intéressant d'évaluer conjointement l'expression de Pax7 et de Myf5 au sein des MDSC en position satellite afin de déterminer si certaines de ces cellules constituent des cellules de réserve.

Les MDSC ont également démontré une efficacité dans le rétablissement du phénotype sain chez les chiens GRMD. Leur participation à la formation de fibres musculaires s'accompagne effectivement d'une restauration de la dystrophine mais également d'une réorganisation du complexe associé à la dystrophine, avec une réexpression du β-dystroglycane au niveau de la membrane, et d'une répression de l'utrophine, une protéine apparentées à la dystrophine exprimée sur les fibres matures au cours des dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker (κατρατί, 1992; κατρατί et al., 1993; Nguyen et al., 1991; Nguyen et al., 1995; Rivier et al., 1999; Shim and Kim, 2003; Taylor et al., 1997). Cependant, comme la majorité des études de transplantation cellulaire par voie intramusculaire, notre exploration des muscles injectés a été réalisée en coupes transversales permettant d'observer l'expression de la dystrophine au sein des faisceaux de fibres musculaires. Cette étude devra être menée ultérieurement en coupes longitudinales afin d'évaluer l'expression de la protéine le long de la fibre. Ce genre de résultat reste encore trop peu cité dans la bibliographie actuelle alors qu'il constitue un élément supplémentaire dans la détermination de l'efficacité thérapeutique des cellules candidates à la thérapie cellulaire de la DMD.

On peut noter une grande variation au sein des MDSC chez la souris, tant au niveau du phénotype, que des propriétés en culture ou des potentialités en thérapie. De nombreuses études se sont intéressées à la variation du potentiel des cellules à caractère souche avant et après passage en culture, et ont montré un effet délétère du passage *in vitro* sur leurs propriétés. Ainsi, l'injection intramusculaire chez la souris *mdx* de 10<sup>4</sup> MDC (Pax7<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/Sca1<sup>-</sup>) restaure l'expression de la dystrophine dans près de 3,5 fois plus de myofibres lorsque les cellules sont natives (c'est-à-dire considérées directement à l'issue de leur isolement tissulaire) comparées à ces mêmes cellules

après quelques jours en culture (Montarras et al., 2005). Récemment, l'injection de cellules myogéniques (CD56<sup>+</sup>), endothéliales (CD34<sup>+</sup>/CD144<sup>+</sup>) et myo-endothéliales (CD56<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD144<sup>+</sup>) au sein de muscles lésés de souris SCID a permis de mettre en évidence que ces trois populations avaient une capacité à régénérer des fibres musculaires mais que celle-ci était plus faible après une amplification in vitro des cellules (Zheng et al., 2007). De la même façon, la transplantation d'une myofibre isolée associée à la présence de seulement sept cellules satellites a montré des résultats bien supérieurs à ceux obtenus après injection de myoblastes. En effet, cette procédure expérimentale se traduit par la formation de plus de cent nouvelles myofibres contenant plusieurs milliers de noyaux (Collins et al., 2005). Les raisons précises de cette différence de potentiel, répertoriées entre les cellules natives et celles qui sont amplifiées in vitro, restent à définir mais il semble acquis que le changement d'environnement physiologique (niche), par défaut d'apport de certains facteurs dans les milieux de culture mais également de contact avec les autres types cellulaires normalement présents au sein du tissu, participe à cette réduction marquée de l'efficacité de régénération. Dans notre étude menée chez le chien, nos cellules ont été cultivées dans des milieux définis pour la culture de myoblastes. La principale critique à cette étape est le défaut d'apports en facteurs essentiels pour permettre une expansion de la population des progéniteurs in vitro, tout en conservant leurs propriétés biologiques intactes. Dans la bibliographie, les étapes d'amplification in vitro de cellules souches MDSC organisées en myosphères sont réalisées dans un milieu de prolifération contenant des facteurs de croissance (b-FGF, insuline, EGF) et du LIF, un facteur classiquement utilisé pour la culture de cellules souches en particulier embryonnaires. Ces facteurs sont responsables du maintien du phénotype non différencié des cellules en prolifération (Nomura et al., 2007; Sarig et al., 2006). Enfin, afin de conserver au maximum le caractère natif des cellules souches, il est maintenant conseillé de limiter au maximum l'adhérence des cellules au support de culture. En effet, la fixation des cellules participe à leur activation et au déclenchement de sécrétions de facteurs trophiques. Ces événements aboutissent indéniablement à l'induction des cellules d'intérêt. Il sera donc particulièrement intéressant de s'intéresser, dans la suite de ce travail, aux conditions de culture permettant l'amplification des cellules des « myosphères » en mode non adhérent avec l'utilisation de supports de culture « low attachment » composés de substrats hydrophobes ou de matrice tridimensionnelle.

Dans notre étude, la transplantation des cellules souches d'intérêt a été réalisée par voie intramusculaire. Cette étape a été primordiale dans l'établissement du potentiel myogénique régénératif in vivo de nos MDSC canines. Cependant, tant que nous n'aurons pas exploré les capacités de nos cellules avec d'autres modalités d'injection, nos expériences se cantonneront à des essais préliminaires dont l'efficacité est nécessairement très limitée par rapport aux capacités théoriques du système. La restauration de la dystrophine dans le muscle DMD dépend aussi bien de la quantité de cellules injectées, de la répétition des injections que du moment où elles sont pratiquées. De plus, la voie d'administration systémique semble aujourd'hui représenter un passage obligatoire pour parvenir à une diffusion suffisante des cellules injectées au sein d'un muscle, ou dans plusieurs muscles à la fois. Les expériences menées avec les mésoangioblastes chez le chien GRMD révelent plus de 70% de fibres dystrophine positives dans les muscles à la suite de 5 injections intraartérielles, de 50 millions de cellules, espacées d'un mois d'intervalle. D'autre part, nous avons injecté nos MDSC chez des chiens de 3-4 mois, les résultats mitigés obtenus par rapport à ceux publiés chez la souris soient dûs au contexte tissulaire. La transplantation de MDSC doit être envisagée chez des sujets les plus jeunes possibles. Le chien GRMD est celui qui développe la pathologie la plus proche de la myopathie de l'homme, avec une évolution histologique semblable, notamment la fibrose et la déplétion progressive en cellules satellites. Il est donc indispensable d'agir précocement afin de traiter le muscle pathologique avec l'installation de la fibrose, de limiter les réactions immunes face aux cellules greffées et d'engendrer un phénomène participatif bénéfique du pool de précurseurs myogéniques présents in situ.

La thérapie cellulaire a le même but que la thérapie génique, à savoir permettre la réexpression d'une protéine fonctionnelle dans les fibres musculaires. Cependant, les difficultés de la thérapie génique en matière de DMD découlent en majeure partie du gigantisme du gène DMD (2,22 millions de paires de bases), rendant difficile son insertion dans de nombreux types de vecteurs recombinants. La thérapie cellulaire représente donc une approche intéressante pour le traitement de la DMD car elle permet d'introduire des cellules porteuses d'une copie fonctionnelle du gène de la dystrophine, capables de fusionner avec les fibres existantes. Les travaux futurs de recherche fondamentale et clinique devront donc porter sur l'optimisation des essais de thérapie cellulaire en environnement musculaire. La réussite de cette stratégie thérapeutique dépend en effet de la diffusion des cellules d'intérêt à un grand volume de tissu musculaire et de leur capacité à rétablir une expression persistante de dystrophine dans un grand nombre de fibres mais aussi tout le long de la fibre. Afin d'établir la faisabilité d'une utilisation thérapeutique de cellules souches tissulaires adultes, il sera nécessaire de développer des travaux concernant :

- la caractérisation des différents types de cellules souches somatiques adultes humaines ;

- la définition des conditions d'amplification, de différenciation et des conditions de transduction *ex vivo* des cellules souches adultes humaines ;
- l'analyse des signaux environnementaux modulant la migration des cellules du système vasculaire jusque dans les tissus, et de la possibilité de leur mobilisation *in vivo* dans des contextes définis de stimulation ;
- l'innocuité à court, moyen et long terme de l'utilisation thérapeutique de cellules souches adultes (complications liées à l'administration systémique, implantation dans des tissus autres que le tissu cible et potentiel tumorigène de cellules génétiquement modifiées).

La transplantation de myoblastes, initialement développée dans le but de fournir de nouvelles options thérapeutiques dans le cadre des myopathies héréditaires a été entravé par plusieurs problèmes dont les principaux sont la survie et l'absence de migration des cellules greffées. Ces cinq dernières années, de nombreuses études ont révélé que l'efficacité de la thérapie cellulaire dans les muscles squelettiques pouvait être améliorée avec l'utilisation de cellules spécifiques dérivées du muscle ou de la moelle osseuse qui présentent des propriétés de cellules souches. Les cellules souches adultes ouvrent donc des perspectives intéressantes dans la régénération musculaire. Nous avons présenté ici une population de cellules souches adultes dérivées du muscle de chien, les MDSC, isolées par leur capacité d'adhérence retardée, capables de contribuer à la régénération musculaire et au rétablissement de la dystrophine chez un chien GRMD. Ces résultats encourageants présentent les MDSC telles des cellules susceptibles de pouvoir améliorer sensiblement l'efficacité de la thérapie cellulaire de la DMD et ainsi compatibles avec une utilisation thérapeutique.

# Annexe : Cursus parallèle

Annexe : Cursus parallèle

Thèse d'université et Résidanat en anatomie pathologique

De formation initiale vétérinaire, j'ai entrepris une double formation complémentaire en 4 ans :

une spécialisation en anatomie pathologique vétérinaire (Diplôme d'Etudes Spécialisées en

Anatomie Pathologique Vétérinaire, DESV), formation en 3 ans et une thèse d'université. J'ai

obtenu une bourse DGER/Région Pays de la Loire et une bourse de l'Académie de Médecine pour

ma dernière année.

Le DESV d'anatomie pathologique

La pathologie est l'étude de la nature essentielle des maladies, et spécialement l'étude de leurs

conséquences structurales et fonctionnelles sur l'animal dans son entier, mais également au niveau

des organes, des tissus ou des cellules. Un anatomo-pathologiste étudie les lésions morphologiques

et les anomalies structurales qui caractérisent une maladie particulière, mais également pourquoi ces

lésions se développent et leurs conséquences fonctionnelles (Slauson and Cooper, 2002).

En France, la formation en anatomie pathologique est dispensée dans les quatre écoles

vétérinaires (Alfort, Lyon, Nantes et Toulouse), et sanctionnée par l'obtention du Diplôme d'Études

Spécialisées Vétérinaires (DESV) en anatomie pathologique. Ce diplôme, créé en 1987 et reconnu

par le Ministère de l'agriculture en 1996, délivre le titre de spécialiste français en anatomie

pathologique vétérinaire.

La formation du DESV dure trois ans, pendant lesquels alternent des cours, de la pratique

(réalisation des autopsies, histopathologie, apprentissage des techniques de base employées en

anatomie pathologique), et des stages.

160

Cours : Vingt séminaires sont organisés pendant les trois années de formation. Chaque séminaire, d'une semaine environ, a lieu dans l'une des écoles vétérinaires et regroupe l'ensemble des résidents des quatre écoles. Le sujet de ces séminaires est soit la pathologie d'un organe (par exemple du foie, ou du rein), soit d'un ensemble d'organes (appareil respiratoire ou système endocrinien), soit d'espèces animales en particulier (animaux de rente, animaux sauvages ou de laboratoire). Les conférenciers invités sont à chaque fois spécialisés dans le sujet des conférences et peuvent venir de France, d'Europe, ou du monde entier.

Autopsies: Les résidents réalisent les autopsies de l'école d'affectation pendant les deux premières années de leur résidanat. Cette activité consiste à établir les causes de la mort de l'animal, ou de ses signes cliniques avant la mort, puis de rédiger un rapport synthétique des lésions observées. Environ 500 animaux d'espèces variées, comme des bovins, des chiens, des chats, des chevaux, des oiseaux, mais également des animaux de laboratoire (souris, rat, furet, lapin) ou des animaux sauvages (singes, springboks, dauphins, tigres) sont autopsiés chaque année à l'école vétérinaire de Nantes.

Histopathologie : Chaque semaine, une séance d'histopathologie de 5 à 10 lames est organisée par les enseignants. Lors de ces sessions, chaque résident présente et commente son diagnostic.

Entraînement à la technique : À la fin de leur formation, les résidents doivent maîtriser parfaitement les méthodes d'étude morphologique qui constituent la base des techniques en pathologie : histologie, immunohistochimie, histochimie, cytologie, microscopie électronique.

Stages: Neuf mois de stage doivent être réalisés pendant la formation. J'ai réalisé trois mois de stage à Philadelphie (USA) au sein du laboratoire Mark Haskins (Departments of Pathobiology and Clinical Studies, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104-6051, USA). J'ai alors participé à l'évaluation d'un essai de thérapie génique du myocarde dans un modèle canin de maladie de surcharge lysosomiale (Mucopolysaccharidose VII). L'article correspond à ce travail est présenté plus loin (Article 1).

Les autres mois de stage peuvent être réalisés dans une structure de recherche et doivent conduire à la rédaction d'un mémoire comptant pour l'examen de fin de troisième année. J'ai réalisé ce stage au sein de l'Unité Mixte de Recherche 703 INRA/ENVN, sur ma thématique de recherche.

J'ai également participé à un travail visant à sélectionner des progéniteurs myogéniques sur le critère « taille des cellules » réalisé collectivement avec Grégory Jouvion (étudiant en thèse), sous l'encadrement de Karl Rouger. Les résultats de cette sélection de progéniteurs myogéniques ont fait l'objet d'un article (Article 2).

Les années de résidanat sont évaluées chaque année au mois de juin par des examens théoriques, d'histopathologie et d'autopsie. Le mémoire de recherche est évalué au mois de septembre, à la fin de la troisième année.

J'ai obtenu le DESV d'anatomie pathologique en septembre 2007.

## **Publications**

## Article 1 : Gene Therapy Ameliorates Cardiovascular Disease in Dogs With Mucopolysaccharidosis VII

La mucopolysaccharidose VII (MPS VII) est une maladie de surcharge lysosomiale consécutive à une déficience en  $\beta$ -glucuronidase (GUSB), enzyme impliquée dans le catabolisme des glycosaminoglycanes (GAG). Chez les individus atteints de MPS VII, des lésions cardiaques sont communément observées : endocardiose (épaississement) des valvules mitrales à l'origine d'une régurgitation mitrale ; endocardiose des sigmoïdes aortiques ; cardiomyopathie hypertrophique et dilatée.

Cet article présente les résultats du suivi échocardiographique, biochimique et histopathologique, à long terme, de chiens nouveaux nés MPS VII traités à l'aide d'un vecteur rétroviral par voie intraveineuse.

Six chiens MPS VII nouveaux nés ont reçu, par voie intraveineuse, le vecteur rétroviral contenant la séquence de la GUSB canine. Les paramètres échocardiographiques et biochimiques ainsi que les lésions histopathologiques ont été comparés à des chiens sains et des chiens MPS VII non traités du même âge.

Les études échocardiographiques montrent une amélioration fonctionnelle (diminution de la régurgitation mitrale) dès l'âge de 4 mois, qui progresse et se stabilise à 9, 11 ou 24 mois. Les lésions valvulaires d'endocardiose mitrale diminuent avec le temps. L'activité enzymatique de la GUSB dans le myocarde et l'aorte est élevée et le taux de GAG est faible.

L'ensemble de ces résultats prouvent que l'administration précoce du gène de la GUSB par thérapie rétrovirale améliore à long terme les lésions cardiaques des chiens MPS VII.

## **Heart Failure**

## Gene Therapy Ameliorates Cardiovascular Disease in Dogs With Mucopolysaccharidosis VII

M.M. Sleeper, VMD; B. Fornasari, DVM; N.M. Ellinwood, DVM, PhD; M.A. Weil, AS; J. Melniczek, VMD; T.M. O'Malley, BS; C.D. Sammarco, BVSc, MRCVS; L. Xu, MD; K.P. Ponder, MD; M.E. Haskins, VMD, PhD

Background—Mucopolysaccharidosis VII (MPS VII) is a lysosomal storage disease caused by deficient β-glucuronidase (GUSB) activity resulting in defective catabolism of glycosaminoglycans (GAGs). Cardiac disease is a major cause of death in MPS VII because of accumulation of GAGs in cardiovascular cells. Manifestations include cardiomyopathy, mitral and aortic valve thickening, and aortic root dilation and may cause death in the early months of life or may be compatible with a fairly normal lifespan. We previously reported that neonatal administration of a retroviral vector (RV) resulted in transduction of hepatocytes, which secreted GUSB into the blood and could be taken up by cells throughout the body. The goal of this study was to evaluate the effect on cardiac disease.

Methods and Results-Six MPS VII dogs were treated intravenously with an RV-expressing canine GUSB. Echocardiographic parameters, cardiovascular lesions, and biochemical parameters of these dogs were compared with those of normal and untreated MPS VII dogs.

Conclusions—RV-treated dogs were markedly improved compared with untreated MPS VII dogs. Most RV-treated MPS VII dogs had mild or moderate mitral regurgitation at 4 to 5 months after birth, which improved or disappeared when evaluated at 9 to 11 and at 24 months. Similarly, mitral valve thickening present early in some animals disappeared over time, whereas aortic dilation and aortic valve thickening were absent at all times. Both myocardium and aorta had significant levels of GUSB and reduction in GAGs. (Circulation. 2004;110:815-820.)

Key Words: cardiovascular diseases ■ gene therapy ■ lysosomes ■ mucopolysaccharidosis

The mucopolysaccharidoses (MPS) are a family of lysosomal storage diseases resulting from defective catabolism of glycosaminoglycans (GAGs) by 1 of 11 enzymes. 1,2 In humans, the most common cardiovascular lesion, regardless of MPS type, is thickening of the mitral valve with regurgitation or stenosis.4 Aortic valve thickening and hypertrophic cardiomyopathy are the next most common lesions, with endocardial thickening and dilated cardiomyopathy also recognized.3 GAGs accumulate in the valve leaflets, with secondary fibrosis and nodular deformation. Primary myocardial involvement and infiltration of the coronary arteries with GAGs can also occur.4 Cardiac involvement is present in most patients with MPS, and the lesions are progressive, with risk of death as a result of congestive heart failure.3

A colony of MPS VII (β-glucuronidase [GUSB]-deficient) dogs5 have a mutation resulting in a single amino acid substitution, and cardiac abnormalities in affected dogs have been reported previously.6,7

Enzyme replacement therapy, the intravenous injection of normal enzyme,8 has been successful in MPS VI mice, MPS I dogs9 and cats,10 and human MPS I patients11; however, cardiac function was not specifically evaluated.12 Bone marrow transplantation (BMT) has been effective in MPS VII dogs6 and also appeared to be beneficial in some MPS I, IV, and VI children,13,14 Cardiac lysosomal storage was reduced in the MPS VII mouse after BMT, and GUSB activity was 53% of normal.15,16 A gene transfer experiment in the MPS VII mouse revealed that by 16 weeks of age, there was histochemical evidence of GUSB throughout the myocardium and a significant reduction in histological vacuolation in cardiac valves,17

The present report describes the detailed, long-term follow-up and histopathology of the cardiovascular features of neonatal dogs with MPS VII treated with intravenous retroviral vector (RV) gene therapy.7 We previously reported improved echocardiographic findings at 9 months after birth.

## Methods

## Animals

Dogs were raised under National Institutes of Health and US Department of Agriculture guidelines for the care and use of animals

Received August 29, 2003, de novo received December 23, 2003; revision received April 8, 2004; accepted April 27, 2004.

From the Departments of Clinical Studies (M.M.S.) and Pathobsology (B.F., N.M.E., M.A.W., J.M., T.M.O., M.E.H.), School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, Red Bank Veterinary Referral Center, Red Bank, NJ (C.D.S.); and the Departments of Internal Medicine and Biochemistry and Molecular Biophysics, Washington University School of Medicine, St Louis, Mo (L.X., K.P.P.)

The Data Supplement Movies are available with the online version of this article at http://www.circulationaha.org.

Correspondence to Dr M. Sleeper. Department of Clinical Studies, School of Veterinary Medicine. University of Pennaylvania, Philadelphia, PA 19104 E-mail sleeper@vet.upenn.edu © 2004 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at http://www.circulationaha.org

DOI: 10.1161/01.CIR.0000138747.82487.4B

Downloaded from circ ahajoumas, org by on November 9, 2007

in research. Six MPS VII dogs (M1287, M1312, M1328, M1332, M1337, and M1339) had 20 mL of an RV containing the normal canine GUSB cDNA injected intravenously at 2 to 3 days of age as described previously. One dog (M1287) was pretreated with human hepatocyte growth factor (HGF) before injection of RV.

#### Echocardiography

MPS VII-treated dogs were evaluated by physical examination and echocardiography with a Hewlett Packard 5500 Sonos ultrasound machine. All dogs were restrained in right and left lateral recumbency, with imaging performed from below by use of a cut-out table. The same, blinded sonographer (board-certified veterinary cardiologist) performed and scored all echocardiograms. 2D and M-mode echocardiography was performed with a 7.5- or 5-MHz probe. All valves were interrogated with color flow Doppler and pulse-wave Doppler using a 3.5-mHz transducer. A subjective score was assigned for mitral and aortic valve thickening, aortic root diameter (taken from the short-axis view at the level of the sinases of Valsalva and at the level of the sinotubular junction from a long-axis plane), and quantity of valvular regurgitation. Results were evaluated by paired t test analysis.

## Pathology

Euthanasia of dog M1312 was at 6 months of age with 80 mg/kg of sodium pentobarbital (Veterinary Laboratories, Inc). Dog M1339 died at 7 months of age while under propofol anesthesia. He appeared to be in good health before the procedure. The dogs were perfused with 2 L of cold saline before the collection of tissues, which were frozen immediately on dry ice or placed in buffered 10% formalin. Sections of paraffin-embedded aorta and myocardium 6 μm thick were stained with hematoxylin and cosin. Histochemical staining with naphthol-AS-BI-beta-D-glucuronide for GUSB activity was performed on frozen sections as previously described.

#### B-Glucuronidase and Total Hexosaminidase Assavs

GUSB and total hexosaminidase A activities were measured by use of the respective fluorogenic substrates as described previously. a.u..is Activity was expressed as nanomoles of 4-methylumbelliferone released per hour per milligram protein.

## **GAG Assays**

Total sulfated GAGs were assayed by measurement of Alcian blue on the basis of the principles of Bjornsson<sup>20</sup> as described previously.<sup>9</sup> Samples were normalized to protein concentrations (Biorad)<sup>21</sup> and reported as micrograms total sulfated GAGs per milligram protein.

## Results

We previously reported transduction of hepatocytes from 6 MPS VII dogs with an RV containing a normal copy of the canine GUSB cDNA after intravenous injection into newborns. The dogs had high levels of serum GUSB for 14 months after transfer,7 which have remained stable for more than 3 years (data not shown). No adverse clinical effects were evident from the time of the last report to the present.

## Physical Examination and Echocardiography

Complete physical examinations and echocardiography were performed in untreated MPS VII, RV-treated MPS VII, and normal dogs. At 1 year of age, 3 of 4 untreated MPS VII dogs had murmurs of mitral valve regurgitation (MR), and all 4 dogs had echocardiographic evidence of MR, mitral valve thickening, and aortic root dilation. These results are consistent with our previous evaluation of 13 untreated MPS VII dogs 0.3 to 1.3 years old<sup>6</sup> of which 9 of 13 had murmurs and all had mitral valve thickening, MR, aortic root dilation, and aortic valve thickening. The oldest untreated MPS VII dog evaluated was only 1.3 years old, because MPS VII dogs undergo euthanasia because of the progression of skeletal deformity and an inability to stand or walk beyond 6 months of age. None of the untreated MPS VII dogs had clinical signs consistent with congestive heart failure.

Six RV-treated dogs were evaluated at 4 to 5 months after birth. Three of these dogs were also evaluated by echocardiography at 8 to 9 months and 24 months, and 2 were euthanized at 6 to 7 months. Mitral valves were mildly thickened in 4 (M1312, M1328, M1332, and M1339) of the 6 treated puppies at the time of initial evaluation (4 to 5 months of age). Mitral valve thickening was not detectable at the later times of evaluation (Figure 1). Insignificant MR was present by echocardiography in 2 (M1328 and M1332) of the 4 treated dogs evaluated at 9 to 11 months of age; in all 4, valve thickness was normal, and none of the dogs had murmurs. At 2 years of age, murmurs were still absent, and echocardiography showed normal mitral valve thickness and either minimal (in 1 dog, M1328) or no MR. The mild MR present in M1328 was consistent with the trivial valvular leaks that can often be found in normal dogs with close scrutiny of the valves by use of color flow Doppler. A similar amount of MR. was detected in 3 of the 7 control dogs. The Data Supplement Movies demonstrate color flow Doppler echocardiograms at the mitral valve in an MPS VII dog, an RV-treated MPS VII dog, an HGF/RV-treated MPS VII dog, and an unaffected dog. The color flow Doppler jet of MR is present only in the untreated affected individual.

All RV-treated dogs evaluated had normal thickness of the tricuspid, aortic, and pulmonary valves and no aortic valve insufficiency, and the aortic diameter was subjectively within normal limits at all evaluations (Figure 2). Of 7 control dogs without MPS VII (6 to 38 months old), none had auscultatable murmurs on physical examination. However, 3 of the 7 had mild MR with no other abnormalities detected on echocardiography. All valves were subjectively of normal thickness.

## β-Glucuronidase and Hexosaminidase Activity

Aortic root and left ventricular free wall GUSB activity was quantified. In 4 untreated MPS VII dogs, the GUSB in the aorta and myocardium was 0±0 U/mg (0% of normal) and 0.50±0.6 U/mg (0.5% of normal), respectively, as shown in Figure 3. In the 2 RV-treated MPS VII dogs, the mean GUSB activity in the aorta and myocardium was 16 U/mg (17.5% of normal) and 6 U/mg (19.3% of normal), respectively.

In many lysosomal storage diseases, levels of other lysosomal enzymes are elevated, and the activity falls to normal levels when lysosomal storage is reduced. The hexosaminidase A activity in untreated MPS VII dogs (Figure 3) was 6174±2686 U/mg (1342% of normal) and 1556±179 U/mg (416% of normal) for the aorta and myocardium, respectively. In the 2 RV-treated dogs, the hexosaminidase A activity was reduced to 1500 U/mg (326% of normal) and 681 U/mg (182% of normal) in the aorta and myocardium, respectively.

## **GAG Content**

Untreated MPS VII dogs had 119±34 µg GAG/mg protein (365% of normal) and 2.5±0.6 µg GAG/mg protein (208%

Downloaded from circ.ahajournals.org by on November 9, 2007

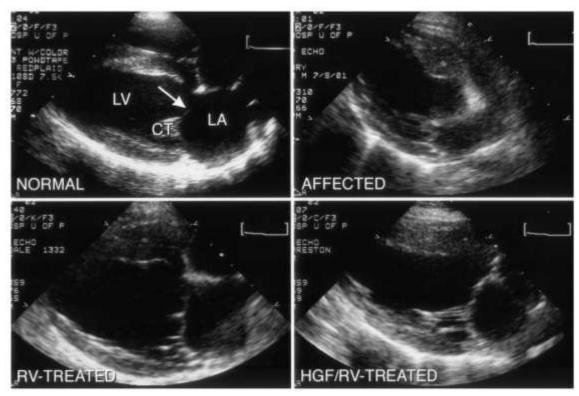


Figure 1. Canine echocardiograms. Long-axis right parasternal echocardiograms showing left atrium (LA), left ventricle (LV), mitral valve apparatus, and chordae tendineae (CT). A, Normal 4-month-old dog. Note thin valve leaflets and CT. B, Untreated 9-month-old MPS VII dog (M1390). Note thickened mitral valve leaflets and CT. C, Neonatal RV-treated dog (M1332) at 14 months. Valve thickness is normal. However, flattening of mitral valve annulus vs normal and HGF/RV-treated dogs is consistent with mild mitral valve prolapse. D, HGF/RV-treated dog (M1287) at 17 months. The valve appears anatomically normal.

of normal) in the aorta and myocardium, respectively (Figure 2). The average GAG levels in the RV-treated MPS VII dogs were reduced to 67.2 μg/mg protein (178% of normal) and 1.6 μg/mg protein (178% of normal) for aorta and myocardium, respectively.

## Pathology

RV-treated MPS VII and control dogs were necropsied at 6 to 7 months of age. In the 2 untreated MPS VII littermates, the mitral valve had nodular thickening 3 to 4 mm in diameter, and the chordae tendineae were thickened (Figure 4B). In contrast, thickening of the mitral valves and chordae tendineae was mild in the RV-treated MPS VII dogs (Figure 4, C and D). Histologically, myocardial lesions in the untreated and RV-treated MPS VII dogs were minimal, with only a few rounded fibroblasts in the perivascular connective tissue with minimal to moderate hypertrophy and moderately vacuolated cytoplasm (data not shown). Histologically, the mitral valve nodules from the MPS VII-affected dogs consisted of loose connective tissue, with most fibroblasts severely hypertrophied with moderate to many cytoplasmic inclusions containing amorphous material, representing lysosomal storage. In 1 dog, subendocardial cells were severely hypertrophic, with highly vacuolated cytoplasm. Histologically, in the RV-

treated dogs, mild rounding of perivascular fibroblasts was present with minimal to moderate hypertrophy and cytoplasm with comparatively few large, pale pink vacuoles containing amorphous material.

Grossly, the aortic wall thickness, particularly the media, was increased in the untreated MPS VII dogs. In the RV-treated dogs, the aortic wall thickness was also increased, and in contrast to normal, the lumen was irregular. Histology of the untreated MPS VII dog aortas revealed that the normally fusiform smooth muscle cells of the media were rounded and severely hypertrophic, with highly vacuolated cytoplasm containing amorphous material (lysosomes distended with GAGs) (Figure 5, C and D). Histology of the aorta from the RV-treated dogs revealed that most smooth muscle cells in the media were fusiform and appeared normal, with few cells appearing rounded, with minimal to moderate hypertrophy and vacuolated cytoplasm (Figure 5, E through H).

In the RV-treated dogs, histochemical staining for GUSB activity showed enzyme activity in some cells throughout the entire thickness of the aortic wall, with most staining present in smooth muscle cells of the media (Figure 6C). GUSB activity was apparent in occasional cells in the myocardium (data not shown).

Downloaded from circ.ahajournals.org by on November 9, 2007

818

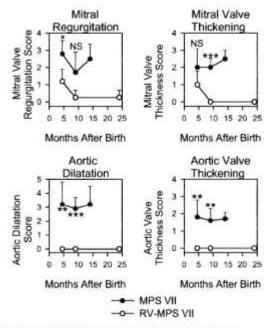


Figure 2. Evaluation of heart valves from untreated and RV-treated MPS VII dogs. Echocardiography was performed on untreated MPS VII (MPS VII) or RV-treated MPS VII (RV-MPS VII) dogs, and degree of MR, mitral valve thickening, aortic dilatation, and aortic valve thickening was determined by use of a scale in which 0 indicates normal and 1 to 4 indicate an abnormal examination of increasing severity, For untreated MPS VII dogs, evaluation involved 5 animals at 4 to 5 months after birth, 7 animals at 7 to 10 months, and 4 animals at 13 to 16 months. For RV-treated MPS VII dogs, evaluation involved 6 animals at 4 to 5 months after birth and 4 animals at 9 to 10 months and at 24 months. Fewer animals were evaluated at later times because of euthanasia of M1312 and M1339 at 6 months. Values for M1312 and M1339 at 4 to 5 months were similar to those of other RV-treated dogs at that time, Average values±SD are shown. Statistical comparisons were made between untreated MPS VII and RV-treated MPS VII dogs at early (4 to 5 month) and intermediate (7 to 10 month) times using Student's ftest. 'P=0.05 to 0.005, "'P=0.005 to 0.005, "'P=0.005 to 0.0005, and NS indicates no significant difference between values for 2 groups at that time. Statistical comparisons were not performed for last set of values, because times of evaluation differed.

## Discussion

Various MPS syndromes result in cardiovascular abnormalities, which may include valvular thickening, regurgitation and/or stenosis, and aortic dilation. Affected individuals can be treated by providing normal enzyme in 1 of 3 ways: (1) enzyme replacement therapy, (2) BMT, or (3) gene therapy. Enzyme replacement therapy and BMT have both been successful in reducing the cardiac manifestations of MPS in animals and humans.<sup>6,22–25</sup> However, enzyme replacement therapy is expensive and requires frequent, lifelong administration, and BMT has traditionally resulted in substantial risks for patients,<sup>26,27</sup> although recent development of nonablative marrow transplant with high cell dosage has proved to be effective and safer.<sup>16</sup> One child with MPS VII has been studied after BMT therapy at 12 years of age. Mitral and aortic valve regurgitation did not change in the 15 months

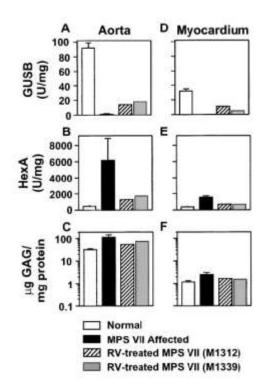


Figure 3. Analysis of GUSB, hexosaminidase A, and GAG levels in sorta and myocardium. All animals were euthanized at 6 to 7 months of age. Aorta and myocardium were collected from 4 normal dogs (Normal), 4 untreated MPS VII (MPS VII Affected), and 2 MPS VII dogs that were treated with RV shortly after birth (RV-treated MPS VII). Samples were homogenized, and GUSB activity, hexosaminidase A activity, and GAG levels were determined and normalized to amount of protein in sample and plotted as average±SD. Levels for aorta and myocardium are plotted on same scale, Hexosaminidase A is another lysosomal enzyme, levels of which are increased in untreated MPS VII dogs.

after therapy,<sup>23</sup> nor did valve abnormalities improve in a group of MPS I, IV, and VI children treated with BMT. The effect on the heart of gene therapy of hematopoietic cells in MPS VII mice<sup>19,38</sup> was not reported.

The cardiovascular abnormalities seen by echocardiography in untreated MPS VII dogs in this and a previous study<sup>6</sup> included thickening of the mitral valve with MR, large aortic dimensions in the short- and long-axis views, and thickening of the aortic valve. All of the 4 RV-treated dogs evaluated when older than 7 months of age had normal valve thickness, with valve anatomy that remained normal at 2 years of age, although 2 had mild MR when <1 year of age. The variation over time suggests that continued remodeling and improvement may occur during the 2 years after therapy.

Histologically, cardiovascular lesions were also dramatically improved in the heart valves and aorta of RV-treated dogs compared with untreated affected littermates.

The GUSB activity was increased in the myocardium and aorta of RV-treated MPS VII dogs, and the GAG content was reduced. The amount of normal enzyme activity needed to correct the metabolic defect and produce phenotypic correc-

Downloaded from circ.ahajournals.org by on November 9, 2007

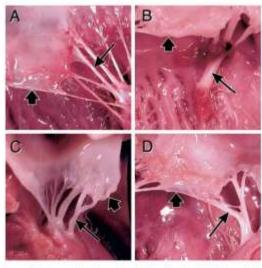


Figure 4. Gross evaluation of mitral heart valve, A, A 6-monthold normal dog; B, a 6-month-old untreated MPS VII dog; C and D, RV-treated MPS VII dogs at 6 and 7 months old (M1312 and M1339, respectively). Thick arrows show edge of septal mitral valve leaflet, and thin arrows show chordae tendineae. In untreated MPS VII dog, thickness of valve and chordae tendineae is increased vs normal (A), whereas lesions are less in treated dogs (C, D) vs untreated dog (B).

tion is only a few percent of normal. 19,29 Although the 2 dogs were perfused with saline after death to remove blood containing GUSB, the procedure may have been imperfect, yielding higher tissue levels. Regardless, the amount of GUSB activity was sufficient to reduce the tissue GAG concentration, albeit not to normal levels. The lack of complete normalization of the cardiac GAG content is somewhat paradoxical, because BMT produced a reduction of GAG to normal levels in 3 BMT-treated dogs, although some residual signs of storage persisted on histopathological assessments. 6

Optimal therapy aims to normalize cardiovascular structures or at least prevent the progressive anatomic deterioration that is often observed in the MPS syndromes. From the findings in this report, the cardiovascular lesions of MPS VII in dogs were ameliorated with neonatal intravenous RV gene therapy. Valve replacement has been performed successfully in humans with MPS IS,30 MPS IIIB,31 and MPS IV32 when progressive deterioration necessitated therapy to prevent further progression of disease. Alternatively, medical management may control congestive heart failure. RV gene therapy appears to be superior to BMT, because a matched donor and pretransplant conditioning are not necessary. No adverse effects secondary to gene therapy have been detected thus far. However, because most children with lysosomal storage diseases are currently not diagnosed at birth, RV gene therapy will need to be evaluated in older MPS VII dogs to determine whether adequate transduction can be achieved and what minimal level of GUSB is necessary to control the cardiovascular disease.

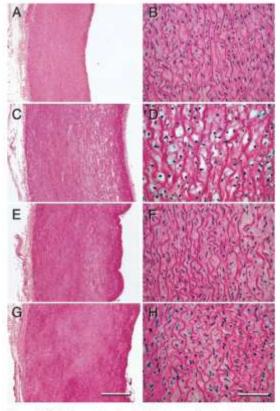


Figure 5. Pathology of sorta. Light micrographs of sortic wall of a 6-month-old normal dog (A, B), a 6-month-old untreated MPS VII dog (C, D), and RV-treated MPS VII dogs (E, F, and G, H; 6 and 7 months old, M1312 and M1339, respectively). Hematoxy-lin and eosin, magnification ×12.5 (A, C, E, G; bar=50 μm) and ×62.5 (B, D, F, H; bar=10 μm).

## Acknowledgments

This work was supported by National Institutes of Health grants DK-54481, RR-02512, RR-T32-07063, and DK-54061. We would like to acknowledge Patty O'Donnell and Jean Zweigle, veterinary students, and the University Laboratory Animal Resources staff for advice and assistance with the animal colony.

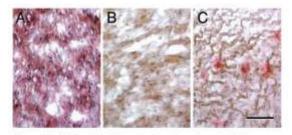


Figure 6. GUSB activity in aorta. Sections of aortas that were obtained at 6 to 7 months after birth were stained for GUSB activity, which appears red, counterstained with hematoxylin (blue for nuclei). Normal (A), untreated affected (B), and RV-treated (C; M1312) dogs. Bar–50 μm.

Downloaded from circ.shajournals.org by on November 9, 2007

#### References

- Holtzman E. Storage diseases. In: Siekevitz P, ed. Lycosomer. New York. Plenum Press; 1989:344-356.
- Neufeld EF, Meunzer J. The nmcopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beandet AL, Sly WS, Valle D, eds. Metabolic and Malecular Basts of Inherited Disease. 8th ed. New York: McGraw Hill, 2001;3421–3452.
- Dangel JH. Cardiovascular changes in children with mucopolysaccharide storage diseases and related disorders: clinical and echocardiographic findings in 64 patients. Eur J Pediatr. 1998:157:534–538.
- Mohan UR, Hay AA, Cleary MA, Wraith JE, Patel RG. Cardiovascular changes in children with mucopolysacchande disorders. Acta Paediatr. 2002;91:799–804.
- Haskins ME, Desnick RJ, DiFerrante N, Jezyk PF, Patterson DF. Betaglucuronidase deficiency in a dog: a model of human mucopolysaccharidosis VII. Pediatr Rev. 1984;18:980–984.
- Sanimarco C, Weil M, Just C, Weimelt S, Hasson C, O'Malley T, Evans SM, Wang P, Casal ML, Wolfe J, Haskins M. Effects of bone marrow transplantation on the cardiovascular abnormalities in canine mucopolysaccharidosis VII. Bone Marrow Transplant. 2000;25:1289–1297.
- Pouder KP, Melmiczek JR, Xn L, Weil MA, O'Malley TM, O'Dounell PA, Knox VW, Aguare GD, Magrier H, Ellinwood NM, Sleeper M, Maguare AM, Volk SW, Mango RL, Zweigle J, Wolfe JH, Haskins ME. Therapeutic neoustal hepatic gene therapy in mucopolysaccharidosis VII dogs. Proc Natl Acad Set U S.A. 2002;99:13102–13107.
- Natowicz MR, Chi MM, Lowry OH, Sly WS. Enzymatic identification of mannose 6-phosphate on the recognition marker for receptor-mediated pinocytosis of beta-glucuronidase by human fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979;76:4322–4326.
- Shull RM, Kakkis ED, McEntee MF, Kama SA, Jonas AJ, Neufeld EF. Enzyme replacement in a canine model of Hurler syndrome. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1994;91:12937–12941.
- Kakkis ED, Schuchman E, He X, Wan Q, Kania S, Wiemelt S, Hasson CW, O'Malley T, Weil MA, Agusire GA, Brown DE, Haskins ME. Enzyme replacement therapy in feline mucopolysacchandosis I. Mol. Genet Metab. 2001;72:199–208.
- Kakavanos R, Turner CT, Hopwood JJ, Kakkis ED, Brooks DA. Immune tolerance after long-team enzyme-replacement therapy among patients who have mucopolysaccharidosis I. Lancer. 2003;361:1608–1613.
- Sands MS, Vogler C, Kyle JW, Grubb JH, Levy B, Galvin N, Sly WS. Birkenmeier EH. Enzyme replacement therapy for murine mucopolysaccharidosis type VII. J Clin Invest. 1994;93:2324–2331.
- Gatzoulis MA, Vellodi A, Redington AN. Cardiac involvement in mucopolysaccharidoses: effects of allogeneic bone marrow transplantation. *Arch Dts Child*. 1995;73:259–260.
- Vinallonga X, Sanz N, Balaguer A, Miro L, Ortega JJ, Casaldaliga J. Hypertrophic cardiomyopathy in mucopolysaccharidoses: regression after bone marrow transplantation. *Pediatr Cardiol*. 1992;13:107–109
- Birkenmeser EH, Barker JE, Vogler CA, Kyle JW, Sly WS, Gwynn B, Levy B, Pegors C. Increased life span and correction of metabolic defects in murine unicopolysaccharidosis type VII after syngenesc bone marrow transplantation. Blood. 1991;78:3081–3092.
- Soper BW, Lessard MD, Vogler CA, Levy B, Beamer WG, Sly WS, Barker JE. Nonablative neonatal marrow transplantation attenuates functional and physical defects of beta-glucuronidase deficiency. *Blood*. 2001, 97:1498–1504.
- Daly TM, Vogler C, Levy B, Haskins ME, Sands MS. Neonatal gene transfer leads to widespread correction of pathology in a murine model of

- lysosomal storage disease. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1999;96: 2296-2300.
- Okada S, O'Brien JS. Tay-Sachs disease: generalized absence of a beta-D-N-acetylhexosaminidase component. Science. 1969;165:698-700.
- Wolfe JH, Sands MS, Barker JE, Gwynn B, Rowe LB, Vogler CA. Birkenmeier EH. Reversal of pathology in marine micopolysaccharidosis type VII by somatic cell gene transfer. Nature. 1992;360:749–753.
- Bjørnsson S. Quantitation of proteoglycans as glycosammoglycans in biological fluids using an Alcian blue dot blot analysis. Anal Biochem. 1998;256:229–237
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248–254.
- Norrdin RW, Simske SJ, Gaarde S, Schwardt JD, Thrall MA. Bone changes in mucopolysacchandosis VI in cats and the effects of bone marrow transplantation mechanical testing of long bones. Bone. 1995; 17:485–489
- Yamada Y, Kato K, Sukegawa K, Tomatsu S, Fukuda S, Emura S, Kojima S, Matsuyama T, Sly WS, Kondo N, Orni T. Treatment of MPS VII (Sly disease) by allogeneic BMT in a female with homozygous A619V mutation. Bone Marrow Transplant. 1998;21:629–634.
- Vellodi A, Young E, Cooper A, Lidchi V, Winchester B, Wraith JE. Long-term follow-up following bone marrow transplantation for Hunter disease. J Inharit Metab Dis. 1999;22:638–648.
- Auclair D, Hopwood JJ, Brooks DA, Lemontt JF, Crawley AC. Replacement therapy in mucopolysaccharidosis type VI: advantages of early onset of therapy. Mal Genet Matab. 2003;78:163–174.
- Peters C, Balthazor M, Shapiro EG, King RJ, Kollman C, Hegland JD, Henslee-Downey J. Trigg ME, Cowan MJ, Sanders J, Bunin N, Weinstein H, Lenarsky C, Falk P, Harris R, Bowen T, Williams TE, Grayson GH, Warkentin P, Sender L, Cool VA, Crittenden M, Packman S, Kaplan P, Lockman LA, et al. Outcome of unrelated donor bone marrow transplantation in 40 children with Hurler syndrome. Blood 1996:87:4894—4902.
- 27. Peters C, Shapiro EG, Anderson J, Henslee-Downey PJ, Klemperer MR, Cowan MJ, Saunders EF, deAlarcon PA, Twist C, Nachman JB, Hale GA, Harris RE. Rozans MK, Kurtzberg J, Grayson GH, Williams TE, Lenarsky C, Wagner JE, Krivit W. Hurler syndrome, II. outcome of HLA-genotypically identical sibling and HLA-haploidentical related donor bone marrow transplantation in fifty-four children. The Storage Disease Collaborative Study Group. Blood. 1998.91:2601–2608.
- Marechal V, Naffakh N, Danos O, Heard JM. Disappearance of lysosomal storage in spleen and liver of mucopolysaccharadosis VII mice after transplantation of genetically modified bone marrow cells. Blood. 1993;82:1358-1365.
- Stramm LE, Wolfe JH, Schuchman EH, Haskins ME, Patterson DF, Aguirre GD. β-Glucuronidase mediated pathway essential for retinal pigment epithelial degradation of glycosamanoglycans. Exp Eye Res. 1990; 50:521–532.
- Masuda H, Morishita Y, Taira A, Kuriyama M. Aortic stenous associated with Scheie's syndrome: report of successful valve replacement. Chest. 1993;103:968–970.
- Muenzer J, Beekman RH, Profera LM, Bove EL. Severe untral insufficiency in mucopolysaccharidosis type III-B (Sanfilippo syndrome). Podiatr Cardiol. 1993;14:130–132.
- Tan CT, Schaff HV, Miller FA Jr, Edwards WD, Karnes PS, Valvular heart disease in four patients with Maroteaux-Lamy syndrome. Circulation. 1992;85:188–195.

# Article 2 : Functional properties of muscle-derived cells related to morphological characteristics

Nous avons cherché à déterminer si la taille des MDC fraîchement extraites pouvait constituer un paramètre utile pour séparer des cellules avec des propriétés comportementales différentes. Pour cela, nous avons adapté la technique d'élutriation aux MDC afin de pouvoir dans un premier temps séparer ces dernières en fonction de leur taille. Cette technique de tri précoce présente un double avantage : tout d'abord, elle permet de travailler sur des cellules fraîchement extraites, autrement dit des cellules dont les propriétés n'ont pas été altérées par des contextes expérimentaux tels que la culture cellulaire connue pour modifier de nombreuses caractéristiques cellulaires. Ensuite, en reposant sur un critère purement morphologique, elle permet de s'affranchir de l'utilisation de marqueurs qui ne sont pas toujours disponibles dans des modèles autres que le modèle murin. Enfin, l'élutriation ne modifie pas l'ultrastructure des cellules et est réalisée en milieu stérile, ce qui permet d'étudier par la suite le comportement des cellules triées in vitro.

L'ensemble des résultats concernant la mise en évidence d'une relation entre les caractéristiques morphologiques et les propriétés fonctionnelles des MDC a fait l'objet d'un article composant le corps de cette partie. Nous ne présenterons donc, dans ce résumé, qu'une synthèse des points importants.

Une analyse morphométrique nous a tout d'abord permis de montrer que les MDC présentent une grande diversité de taille avec un intervalle allant de 4 à 10  $\mu$ m : 70% des MDC ont une taille comprise entre 6,5 et 7,5  $\mu$ m et environ 10 et 20% des MDC ont respectivement une taille inférieure ou égale à 5,5  $\mu$ m et supérieure à 7,5  $\mu$ m. En utilisant l'élutriation, nous avons choisi d'isoler 3 fractions cellulaires représentatives de la diversité de taille présente au sein des MDC : FR5, contenant en grande majorité les petites cellules dont le diamètre est inférieur ou égal à 5,5  $\mu$ m ; FR7, contenant les cellules de taille intermédiaire, qui sont les plus représentées au sein de la population initiale (diamètre compris entre 6,5 et 7,5  $\mu$ m) ; et FR9, contenant les cellules de grande taille (diamètre compris entre 8,5 et 9,5  $\mu$ m).

Une analyse phénotypique a été réalisée sur les MDC et les cellules issues des 3 fractions d'élutriation et a démontré que la taille des cellules est associée à l'expression spécifique de marqueurs myogéniques, révélant ainsi une variation du niveau d'engagement dans le voie de

différenciation myogénique selon le diamètre cellulaire. En effet, les cellules de FR5 expriment très faiblement les marqueurs myogéniques précoces (M-cadhérine : 17±10%; Pax7 : 3±3%) au contraire des cellules de FR7 et FR9 (M-cadhérine : 95±1% et 95±5%; Pax7 : 90±4% et 62±6% pour FR7 et FR9 respectivement). In vitro, les petites cellules montrent une activité myogénique limitée (faible prolifération, différenciation tardive), alors que les cellules de plus grand diamètre présentent un potentiel myogénique croissant parallèlement à leur taille. Une analyse ultrastructurale a également révélé que les plus petites cellules partagent de nombreuses caractéristiques de cellules quiescentes, peu actives métaboliquement (rapport nucléocytoplasmique élevé, faible densité en organites cytoplasmiques, en microvésicules de pinocytose et en gouttelettes lipidiques) alors que les cellules de plus grand diamètre présentent des caractéristiques ultrastructurales de cellules actives (inversement du rapport nucléo-cytoplasmique, cytoplasme très abondant en organites cytoplasmiques et en microvésicules de pinocytose).

Collectivement, ces résultats démontrent pour la première fois que la taille des MDC à l'issue de l'extraction tissulaire est un bon indicateur de l'état de progression des cellules dans la voie myogénique et que le critère « taille des cellules » est utile pour la séparation précoce de cellules plus ou moins avancées dans le programme myogénique.

## ORIGINAL PAPER

## Functional properties of muscle-derived cells related to morphological characteristics

Gregory Jouvion • Karl Rouger • Benoît Fornasari • Gwenola Bougras • Isabelle Leroux • Jacqueline Segalen • Yan Cherel

Accepted: 8 May 2006 / Published online: 10 June 2006 © Springer-Verlag 2006

Abstract Satellite cells represent a specific lineage of myogenic progenitors that allow skeletal muscle postnatal growth and repair. They have been described as being heterogeneous in nature, a characteristic associated with functional disparities. Here, we aimed at determining whether the morphometric characteristics of freshly extracted turkey muscle-derived cells (MDC) could represent a distinctive criterion between them and could also be associated with their behavioural features. Morphometric analysis showed that MDC displayed wide cell size diversity, from 4 to 10 µm. Lineage marker analysis was performed on MDC sorted by their size using counterflow centrifugal elutriation and showed that the cell size was associated with the specific expression of myogenic markers, revealing different commitment levels. In vitro, the smallest MDC exhibited limited myogenic activity while larger MDC displayed a myogenic potential that increased with their size. Ultrastructural analysis

Gregory Jouvion and Karl Rouger contributed equally to this work.

G. Jouvion · K. Rouger (□) · B. Fornasari · I. Leroux · Y. Cherel
INRA, UMR703, Ecole Nationale Vétérinaire,
Atlanpole—La Chantrerie, BP 40706, Nantes,
44307, France
e-mail: rouger@vet-nantes.fr

G. Bougras INSERM, UMR601, Institut Fédératif de Recherche 26, Nantes, 44035, France

J. Segalen Université de Rennes I, Service de Microscopie Electronique, Rennes, 35065, France revealed that the smallest MDC shared quiescent cell features, whereas the other cells displayed metabolic activity that also increased as a function of their size. Collectively, our results demonstrate that the size of freshly extracted MDC is indicative of their respective progression towards myogenic differentiation lineage. This criterion could be useful for the early separation of more or less committed cells in the myogenic programme.

Keywords Skeletal muscle · Satellite cells · Elutriation · Morphometry · Turkey

## Introduction

Muscle satellite cells (SC) were first described anatomically as small fusiform cells lying between the basal lamina and the sarcolemma of muscle fibres (Mauro 1961). Succeeding to embryonic and foetal myoblasts, these undifferentiated mononuclear cells are present at birth (Wilkie et al. 1995) and persist throughout life to ensure postnatal growth and repair in response to injuries and maintenance of skeletal muscle (Yablonka-Reuveni 1995; Seale and Rudnicki 2000). In contact with the myofibre membrane, they are mitotically quiescent in the Go phase of the cell cycle (Moss and Leblond 1970; Schultz et al. 1978; Bischoff 1986). After disruption of the cell membrane, individual SC migrate, rapidly undergo extensive proliferation for a few days, differentiate into myoblasts and, finally, fuse with existing muscle fibres or with other SC to form nascent myofibres (Campion 1984; Darr and Schultz 1987). The number of quiescent SC in adult muscle remains relatively constant (2-5% of all sublaminal



nuclei), in spite of repeated cycles of muscle degeneration/regeneration, which is indicative of a self-renewal capacity for these cells (Gibson and Schultz 1983; Schultz and Jaryszak 1985).

Satellite cells have been described as forming a heterogeneous population with identification of different sub-populations displaying distinct biological, biochemical and morphological properties. In vitro studies performed on various species revealed differences between SC based on their proliferation rate (Schultz and Lipton 1982; Molnar et al. 1996; Schultz 1996; Lagord et al. 1998) and their fusion ability (Baroffio et al. 1996), as well as on their ability to migrate and/or respond to growth factors (Cossu and Molinaro 1987; McFarland et al. 1993, 1995; Watt et al. 1994). In a previous study, our group showed that SC with a distinct in vitro proliferation rate also intrinsically differed in vivo in their fusion potential (Rouger et al. 2004). An in situ morphometric analysis demonstrated that SC isolated from different muscle types of some animal species were highly heterogeneous in terms of size, with a range of 18-50 μm (Campion 1984). Several electron microscopy studies showed that SC displayed distinct morphological forms depending on their activation level. Indeed, activated SC were characterised by an increased number of pinocytotic vesicles, Golgi apparatus and rough endoplasmic reticulum, as well as a high percentage of euchromatin (Campion et al. 1981; Schultz and McCormick 1994; Roth et al. 2000). Moreover, quantitative ultrastructural differences in SC were observed in rat skeletal muscles between the Extensor digitorum longus (EDL) and the Soleus (SOL), two muscles with metabolic differences; mitochondria, rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus were less frequent in EDL-derived SC as compared with ones derived from SOL (Baranska et al. 1997). Finally, ultrastructural variations can be observed according to age, sex and pathology. For example, cytoplasmic lipofuscine granule density increased with age, in contrast to free ribosomes, rough endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and euchromatin proportion (Schultz 1976; Snow 1977). SC were larger in the skeletal muscles of women than in those of men (Roth et al. 2000), while those observed in the muscle of patients suffering from pathologies such as Duchenne Muscular Dystrophy revealed a significant increase in cytoplasmic micropinocytotic vesicles (Watkins and Cullen 1986).

In the present work, we aimed at determining if the morphometric characteristics of freshly extracted muscle-derived cells (MDC) could be used to discriminate between cell sub-populations. We also tried to determine whether their size could be associated with specific behavioural features and thus be used to separate MDC that differed by their potential in muscle fibre formation at an early stage. Morphometric analysis showed that MDC displayed a wide range of sizes, from 4 to 10 µm. On the basis of phenotypic assessment performed on three representative cell fractions collected by counterflow centrifugal elutriation (CCE), we established that this cell size diversity was not due to a contamination of muscle cell suspension by endothelial, haematopoietic or fibroblastic cells, but instead reflected the presence of cells with different myogenic commitment levels. Using primary and clonal cultures, we found that the smallest MDC were able to only slightly proliferate and differentiate, whereas larger ones exhibited myogenic potential that increased with their size. Electron microscopy investigations revealed that the smallest MDC displayed many features of dormant cells while the other MDC shared ultrastructural characteristics of metabolically active cells, which increased as a function of their size. Taken together, our data showed for the first time that the size of freshly extracted MDC is correlated with their progression towards myogenic differentiation lineage. This study demonstrates that this structural criterion could be used to enrich myogenic cell fractions with uncommitted cells, early stage SC or fully committed precursors, at an early stage.

## Materials and methods

## Animals

Male turkeys (Meleagris gallopavo) derived from a heavy-medium-line commercial BUT-T9 strain (British United Turkey Limited, Warren Hall, Broughton, Chester CH4OEW, UK) were used in this study. The French National Institute of Agronomic Research (INRA) guidelines for the care and use of laboratory animals were followed.

## Muscle-derived cell isolation

Muscle-derived cells were isolated from the *Pectoralis* superficialis muscle of 7-day-old animals, as previously described (Rouger et al. 2004). For each experiment (n=5), at least 30 animals were used. In brief, muscles were cleaned to remove connective tissue and blood, washed with sterile phosphate-buffered saline (PBS, VWR, Strasbourg, France) and then digested for 1 h at 37°C with 0.12% pronase E solution (Sigma, St Louis, MO, USA). Following differential centrifugation and sequential filtering through 40-µm-pore-diameter nylon



mesh (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), the cells were centrifuged at 1,500 rpm for 15 min and resuspended in PBS. Erythrocyte lysis was performed by hypotonic shock, using ice-cold ammonium chloride buffer (170 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, and 0.1 mM EDTA, Sigma), as previously described (Hansel et al. 1991). Cells were resuspended in 199 medium (M199, VWR) with 10% foetal calf serum (FCS, Sigma), 1% penicillin streptomycin fungizon (PSF, Sigma) and 1% L-Glutamin (Sigma), and counted using a hemocytometer.

## Counterflow centrifugal elutriation

Muscle-derived cells' separation according to cell size was performed with a Beckman Avanti J-20 centrifuge and a JE-5.0 rotor (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA). Loading of at least 4×108 cells was performed at 19°C with a flow rate of 4 ml/min and a rotor speed of 2,500 rpm. The elutriation medium was 0.9% sodium chloride injection USP (Baxter, Deerfield, IL, USA). A constant and precise flow rate was maintained by an external Masterflex peristaltic pump (Cole-Parmer Instrument, Barrington, IL, USA). After the cells had been loaded into the 4-ml separation chamber, the flow rate was slowly increased to 6 ml/min while maintaining rotor speed, and a volume of 200 ml was collected to isolate cells with a diameter of between 4.5 and 5.5 µm. The flow rate was then increased incrementally and the same volumes were collected at 11.5 and 19 ml/min in order to obtain cells with a diameter of between 6.5-7.5 and 8.5-9.5 µm, respectively. The cells collected in each fraction (referred to as FR5, FR7 and FR9, respectively) were centrifuged (1,500 rpm, 25°C, 10 min), resuspended in a proliferation medium [44% Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, VWR), 44% M199, 10% FCS, 1% PSF and 1% L-Glutamin], and counted. Four distinct cell suspensions were independently subjected to the CCE procedure.

Lineage specific marker analysis of muscle-derived cells

## Cytospin preparation

Freshly extracted MDC and cells from each elutriated fraction were centrifuged at 1,500 rpm for 5 min and resuspended with PBS to a final concentration of  $4\times10^6$  cells/ml. Forty-thousand cells were deposited on polysin<sup>TM</sup> microscope slides that were dried at 37°C for 30 min and stored at  $-20^{\circ}$ C, until further processing. To determine their lineage status, an immunocytochemistry analysis was performed using the following antibodies: rabbit polyclonal antibody to human M-cadherin

(dilution 1:50; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), monoclonal antibody (mAb) to chicken Pax7 (dilution 1:10; DSHB, Iowa City, IA, USA), and mAb to quail QH1 (1:40; DSHB). M-cadherin, a Ca2+-dependent cell-cell adhesion molecule, is a SC-specific marker (Moore and Walsh 1993; Irintchev et al. 1994), and the paired-box transcription factor Pax7 is reported to play an essential role in SC biogenesis (Seale et al. 2000; Oustanina et al. 2004). These Ab were first tested on the whole MDC and subsequently allowed us to determine whether or not cells from the different elutriated fractions were myogenic. QH1 is an mAb that essentially recognises two cell types, the endothelial and haematopoietic cells (Pardanaud et al. 1987). Slides were treated for 30 min with 0.5% triton X-100 and incubated for 20 min with a blocking solution (2% goat serum, 5% dog serum, 2% bovine serum albumin, diluted in PBS), prior to primary Ab incubation. Antirabbit Alexa 488 secondary Ab (1:200, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA), anti-mouse Alexa 488 secondary Ab (1:100; Molecular Probes Inc.) and antimouse TRITC secondary Ab (1:40; Dako, Glostrup, Denmark) were used for M-cadherin, Pax7 and QH1 immunostaining, respectively. Coverlips were mounted using Vectashield containing DAPI nuclear dye (Vector Laboratories), and slides were viewed using a Leica epifluorescence microscope.

## In primary culture

FR5, FR7 and FR9 MDC were seeded at 50,000 cells/ cm<sup>2</sup> in gelatin-coated wells (0.1%, Sigma), maintained for 3 and 5 days, and then tested for Pax7 expression, as described above.

## In clonal culture

Muscle-derived cells of each fraction were cloned by limiting the dilution to a concentration of one cell per well in gelatin-coated 96 multiwell dishes. One hundred ninety-two wells were plated for each elutriated fraction. Medium was changed every 2 days. To discriminate between myogenic and fibroblastic cell proliferation, clonal cultures were tested for expression of the intermediate filament protein desmin at day 8. Desmin was detected with mAb (1:50; Dako), which was revealed by biotin-labelled anti-goat IgG (1:300; Dako) and peroxidase-diaminobenzidine staining.

## Muscle-derived cell proliferation

The proliferation ability of FR5, FR7 and FR9 MDC was assessed in primary and clonal cell cultures.



In primary culture, 50,000 cells/cm<sup>2</sup> were plated onto five replicates in gelatin-coated 96 multiwell dishes and routinely grown at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Medium was replaced every 2 days. At day 1, 4, 6 and 7, one multiwell dish was used to determine the cell number, using the Cell titer 96 Assay (Cell titer 96<sup>TM</sup> AQ<sub>weous</sub> Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI, USA). Based on the conversion of a tetrazolium compound into a formazan product by the mitochondria of viable cells, this is a colorimetric alternative to [3H] thymidine incorporation assays to determine cell proliferation.

In clonal culture, at day 8, the desmin positive (desmin\*) cultures obtained from FR5, FR7 and FR9 MDC were fixed in 70% ethanol at room temperature for 15 min, stained with Giemsa and the cell number in each clonally-derived colony enumerated by microscopic counting of stained nuclei.

#### Muscle-derived cell differentiation

Differentiation of the MDC of each elutriated fraction was studied daily in primary culture by examining the expression of two myosin heavy chain (MHC) isoforms that were differentially expressed at different stages of development. In birds, ventricular, embryonic, neonatal and adult MHC sequentially appeared throughout development and regeneration. Ventricular MHC isoform, which first appeared, was detected using HV11 mAb that reacts with the myosin of adult chicken ventricles (Bandman et al. 1990). Embryonic/adult fast MHC was detected using EB165 mAb, which reacts with fast embryonic MHC isoforms and fast adult MHC in chicken (Cerny and Bandman 1987; Bandman and Bennett 1988). These mAb, specific for chicken MHC, react with turkey myosin isoforms (Maruyama and Kanemaki 1991). Each well containing cells initially seeded at a density of 50,000 cells/cm2 was treated for 30 min with 0.5% Triton X-100, and sequentially incubated for 30 min with 20% (w/v) goat serum diluted in PBS (pH 7.4), and for 60 min with anti-MHC mAb (1:2,500). Cells were washed in excess PBS and then incubated for 30 min with biotin-labelled goat anti-mouse Ab (1:300) before a final wash. MHC isoforms were revealed by peroxidase-diaminobenzidine staining. Classification of cells as myotubes required at least three nuclei within a discernible continuous cell membrane.

## Transmission electron microscopy

Muscle-derived cells from each elutriated fraction were centrifuged at 2,600 rpm for 15 min. The supernatant was removed and the cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer (pH 7.2) for 1 h at 4°C and post-fixed in 1.5% osmium tetroxide in the same buffer for 1 h at room temperature. The cell samples were subsequently dehydrated in a graded ethyl alcohol series, followed by three changes of propylene oxide and embedded in conventional epoxy resin (Epon 812). Ultrathin sections were obtained in an ultra-microtome (Ultracut E, Reichert), mounted on 200-mesh copper grids and stained with 5% (w/v) uranyl acetate in 30% (v/v) ethanol for 20 min, followed by lead citrate for 30 min. The sections were examined under a JEOL transmission electron microscope (JEOL Europe, SA) at 80-kV accelerating voltage.

## Morphometric analysis of muscle-derived cells

To determine the MDC distribution based on their size, more than 300 freshly extracted cells per experiment (n=5) were manually measured using an image analysis system (LUCIA imaging software, Laboratory Imaging Inc., Prague, Czech Republic). For electron microscopy, 100 cells were randomly selected for each elutriated fraction, and then photographed at an initial magnification of 2,700×. Each micrograph was enlarged three times to evaluate the following parameters: mean cross-section surface area of the cell (Sac, μm<sup>2</sup>) and the nucleus (Sa<sub>n</sub>, μm<sup>2</sup>), and the shape coefficients of the cell  $(Q_c)$  and nucleus  $(Q_n)$ . The shape coefficients of the cell and nucleus were described on the basis of the following formula:  $Q=(4\pi S)/P^2$ , where S is the cross-section surface area of the profile of the examined structure and P is the circumference of the profile of the examined structure. The criteria of the mean shape coefficient of cells and nucleus profiles were as follows: when the value Q=1, the cross-section is spherical, and when the value Q<1, the cross section is close to an ellipsoid. The nucleo-cytoplasmic ratio was calculated as Sa<sub>w</sub>/Sa<sub>c</sub>. The degree of cell membrane invagination was also evaluated at this magnification. This parameter was used as the ratio of the theoretical circumference to the measured one (Pt/Pm). Pt was obtained by the following formula:  $Pt=2\pi(d/2)$ , considering that cells have a round shape, and where d is the equivalent diameter measured using LUCIA imaging software. Pm corresponded to the actual measured circumference of the examined structure. Mitochondria and cytoplasm fragments were documented at higher magnification (40,000×). The number of mitochondria per 10 µm<sup>2</sup> of surface area of cytoplasm was counted. Cellular organelles (rough endoplasmic reticulum, micropinocytotic vesicles and lipid droplets) were ranked according to the frequency and extent of their



appearance, so that each organelle was described as not observed (-), rarely (+), occasionally (++) or frequently (+++) observed. All the parameters were measured using LUCIA imaging software. All measurements were completed by the same investigator in a blind control, in duplicate, and reliability was assessed by 15 repeated measurements of cells over several days (coefficient of variation<2%).

## Statistical analysis

All reported data (cell and nucleus size, Sa, nucleocytoplasmic ratio, Q, mitochondria and nucleoli number) were compared among different cell fractions with analysis of variance (ANOVA), followed by Fisher's protected least significant difference test (Fisher PLSD test), using statistical software (Stat View, Brain Power, Calabasas, CA, USA). Proportions of rough endoplasmic reticulum, micropinocytotic vesicles and lipid droplets were checked with the  $\chi^2$  test. Data were reported as mean $\pm$ SD. A value of P<0.05 was considered to be statistically significant.

## Results

## Muscle-derived cell distribution based on size

Immediately after their extraction, MDC size was determined using LUCIA imaging software (Fig. 1a). MDC displayed a large and continuous set of sizes of between 4 and 10  $\mu$ m (independent experiments, n=5). As can be seen in Fig. 1b,  $12\pm5\%$  of all the cells had a diameter of less than 5.5  $\mu$ m (including  $2\pm1\%$  of cells with a diameter of between 4 and  $4.5 \mu$ m),  $66\pm10\%$ 

had a diameter of between 5.5 and 7.5  $\mu m$ , and  $21\pm9\%$  had a diameter exceeding 7.5  $\mu m$  (including  $3\pm2\%$  of cells with a diameter exceeding 9.5  $\mu m$ ). The scattering of the cells with respect to their size revealed that MDC represent a heterogeneous population based on their morphology.

Counterflow centrifugal elutriation with at least  $4\times10^8$  cells was used to separate three MDC fractions differing in size (independent experiments, n=4): (1) the smallest cells, with a diameter of between 4.5 and 5.5  $\mu$ m (FR5), corresponding to  $10\pm3\%$  of the total MDC; (2) cells with a size of between 6.5 and 7.5  $\mu$ m (FR7), representing the most prominent cell fraction in the initial suspension (e.g.  $35\pm3\%$  of the total MDC); and (3) large cells defined by a diameter of between 8.5 and 9.5  $\mu$ m (FR9) (5 $\pm2\%$  of the total MDC). About one third of the loaded MDC was lost by aggregation during the CCE procedure with recoveries ranging from 55 to 70%.

## Phenotypic characterisation of muscle-derived cells

To determine whether such cell size differences could be due to the presence of other cell types in the muscle cell suspension, cells of each elutriated fraction were evaluated for the expression of some proteins related to myogenic, endothelial, haematopoietic and fibroblastic cells. Freshly extracted MDC were used as staining control (Table 1). 88±1% of whole extracted MDC were M-cadherin\*, indicating that cell suspension predominantly contained SC. Pax7\* cells represented 56±6% of all cells, revealing that MDC were mainly composed of quiescent or early activated SC, but also contained fully activated myoblasts, since Pax7 is a marker restricted to the early stages of myogenesis.

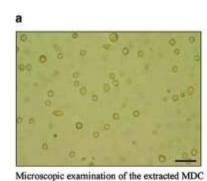
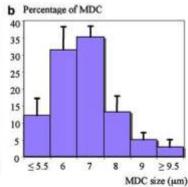


Fig. 1 MDC size analysis. Freshly extracted cells were observed under the light microscope (a, bars 40  $\mu$ m) and measured using an image analysis system, to determine their distribution based on size (b). Results were expressed as a mean of at least 300 values



(n=5 experiments), and error bars represented SD values. MDC size ranged from 4 to 10  $\mu$ m. 66 $\pm$ 10% of all the cells have a diameter of between 5.5 and 7.5  $\mu$ m



As shown in Table 1, many differences in the number of cells expressing both myogenic markers were evident between FR5, FR7 and FR9 (P<0.001). FR7 and FR9 MDC contained the following percentage of cells: M-cadherin,  $95\pm1$  and  $95\pm5\%$ ; Pax7,  $90\pm4$  and 62±6%, respectively. In contrast, FR5 MDC were defined by 17±10% of M-cadherin+ cells and 3±3% of Pax7+ cells. FR7 and FR9 MDC displayed the same elevated percentage of M-cadherin+ cells but differed in the content of Pax7+ cells. FR9 MDC showed a lower percentage of Pax7+ cells, suggesting that these cells contained a greater number of fully activated myoblasts than FR7 MDC. FR5 MDC were characterised by a poor expression for both myogenic markers. To further explore their myogenic potential, cells were seeded in primary culture and maintained for 5 days. It is interesting to note that the evaluation of the Pax7 expression revealed that 62% of FR5 MDC became positive to the transcription factor, suggesting that they could adopt, at least in part, a late myogenic profile.

Using QH1 Ab, the presence of endothelial and haematopoietic cells was investigated. In whole MDC, the percentage of QH1+ cells was 2±0%. 2±1, 3±3 and 4±2% of QH1+ cells were determined in FR5, FR7 and FR9 MDC, respectively. These results showed that freshly extracted MDC contained only a few endothelial and haematopoietic cells and that no elutriated fraction was enriched in both of these cell types.

Finally, to qualify the MDC of each fraction by their content in non-myogenic cells displaying fibroblast-like morphology, cells were seeded under clonal conditions and tested for desmin expression after 8 days. No clonally derived colony was obtained from FR5 MDC, eliminating the possibility that they contained fibro-

Table 1 Expression pattern of specific lineage markers of elutriated fraction-derived MDC

Cell fraction	Percentage of cell types					
	Myogenic cells (%)	Endothelial/ haematopoietic cells (%)				
	(M-cad+ cells)	(Pax7+ cells)	(QH1+ cells)			
FR5	17±10	3±3	2±1			
FR7	95±1	90±4	3±3			
FR9	95±5	62±6	4±2			
Whole MDC	88±1	56±6	2±0			

Forty-thousand cells from each elutriated fraction were deposited on slides and tested for their expression of myogenic specific markers M-cadherin and Pax7, and the endothelial/haematopoietic marker QH1. The percentage of positive cells was determined by counting at least 300 cells in each fraction ative ability that is much more pronounced than that of muscle cells. Desmin\* clonally derived colonies were only observed in FR7 MDC, and they represented 6% of the clones. These data showed that MDC contained only a few fibroblastic cells and that the cell size diversity could not be attributed to a contamination of muscle cells by this type of cell.

Altogether, these results revealed that endothelial, haematopoietic and fibroblastic cells were poorly rep-

blastic cells, which are known to display a high prolifer-

Altogether, these results revealed that endothelial, haematopoietic and fibroblastic cells were poorly represented in each elutriated fraction that differed in their content of cells expressing myogenic markers. FR5 contained cells that displayed a late myogenic induction, while FR7 and FR9 cells seemed to correspond to SC at distinct stages of the myogenic differentiation lineage.

Muscle-derived cell proliferation

In primary culture

Following elutriation, the three cell fractions were seeded in primary culture and the proliferation ability was assessed at day 1, 4, 6 and 7, successively (Fig. 2). All resulting proliferation curves displayed a sigmoid shape that revealed (1) slow proliferation properties between days 1 and 4; (2) increased proliferation properties between days 4 and 6; and (3) a stabilisation after the 6th day. FR5 MDC poorly proliferated until day 4. The number of cells then increased twofold between day 4 and day 6, and remained constant until day 7, at which time there were four times more cells than at the beginning. FR7 SC were characterised by an initial proliferation (between day 1 and day 4), allowing a threefold increase of their number, followed by an intense proliferation level (>3-fold increase in 2 days) and a stabilisation of their proliferation capacity after day 6. Finally, after 7 days in culture medium, their number was ten times greater. Concerning FR9 SC, a sixfold increase in the number of cells was observed over the first 4 days. Between day 4 and 6, the number of cells increased more than twofold. After 7 days in culture, their number was 15 times greater compared to the number of cells initially seeded. MDC from the three elutriated fractions displayed distinctly different proliferation curves in terms of intensity. FR5 MDC were defined by constant poor proliferation ability compared to that observed for the cells of the two other fractions. The highest levels of proliferation were seen in FR9 SC-derived culture. The main difference observed between FR7 and FR9 SC was the growth rate mentioned between day 1 and 4, which was twice as great as for FR9 SC.



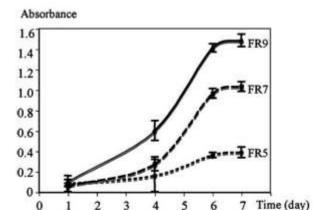


Fig. 2 Evolution over time of MDC proliferation. After elutriation, cells of each fraction were seeded in primary culture and the proliferation ability was assessed at day 1, 4,6 and 7, successively. The figure distinctly showed different proliferation curves between MDC of the different fractions. FR5 MDC displayed a poor proliferation ability that can be observed by a fourfold increase of their number after 7 days in culture compared with 10- and 15fold increases for FR7- and FR9-derived SC, respectively

## In clonal culture

After 8 days, 51 myogenic clonally derived colonies were identified. Twenty-two and 29 clones were obtained in FR7 and FR9, respectively, whereas none could be identified in FR5 (Table 2). This revealed the extreme fragility of the FR5 MDC. The clonally derived colonies of MDC displayed from less than 20 nuclei to more than 200. The average number of nuclei per MDC colony was 42±31 for FR7 and 98±83 for FR9. The standard deviation (SD) revealed a large variation in colony sizes. Concerning FR7 SC, the highest proliferative clonally derived colony was composed of 103 mononucleated cells, and 72.8% of all the colonies contained less than 60 cells. In contrast, 55.2% of myogenic clonally derived colonies obtained from FR9 SC displayed more than 60 cells, of which 27.6% were composed of more than 140 cells. The proliferation ability of FR9 SC (a small fraction representing about 5% of the whole population) was greater than that of the FR7 SC (which corresponded to the most highly represented cells in the freshly extracted cell suspension) (P<0.0001). These data confirmed those previously obtained in primary culture and revealed that the proliferative potential of the MDC was clearly associated with their size.

#### Muscle-derived cell differentiation

Differentiation capacities were studied daily for the MDC of each elutriated fraction by considering their morphology in primary culture (Fig. 3) and expression profiles for MHC isoforms (Table 3). Elutriated fraction-derived cells showed distinct clear-cut in vitro differentiation patterns. After 24 h, some FR9 SC were already fusiform. At day 3, FR9 SC-derived cultures were composed of numerous thin and fusiform cells, positive for MHC isoforms, especially ventricular ones (30% of all the cells). Two days later, they were characterised by the presence of large myotubes with an increased number of nuclei and by more than 70 and 40% positive cells for ventricular and fast embryonic/ adult MHC isoforms, respectively. At day 7, cells expressing both MHC isoforms represented more than 80% of the total cells. Concerning FR7 SC, many had a spindle shape at day 3. Some FR7 SC were positive for ventricular (20%) and fast embryonic/adult (2%) MHC isoforms. At day 5, FR7 SC-derived cultures displayed an increased number of small and scattered myotubes that expressed fast embryonic MHC isoforms (20% of all the cells). Likewise, for FR9 SC, a large majority of cells expressed MHC isoforms at day 7 with more than 80 and 70% of all the cells that were positive for ventricular and fast embryonic/adult MHC isoforms, respectively. At that time, the only difference between FR7- and FR9-derived cultures was the presence of thicker and long-shaped myotubes that also contained many more nuclei in FR9 ones. After 24 h,

Table 2 Distribution of the MDC clonally derived colonies in the elutriated fractions

Cell fraction	Colony number	Size of MDC clonally derived colonies					
		≤20 cells (%)	20-60 cells (%)	60–100 cells (%)	100-140 cells (%)	>140 cells (%)	number
FR5	None	None	None	None	None	None	None
FR7	22	36.4	36.4	22.7	4.5	None	42±31
FR9	29	13.8	31	13.8	13.8	27.6	98±83

Following elutriation, cells were plated under clonal conditions and cultured for 8 days. The myogenic nature of the clonally derived colonies was determined by assessment of the desmin expression, and cells in each desmin\* colony were stained with Giemsa and enumerated by counting stained nuclei



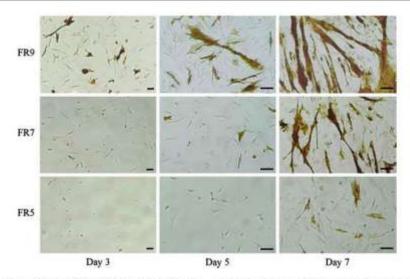


Fig. 3 Evolution over time of MDC differentiation. Cells of each fraction were seeded in primary culture, examined daily with regard to their morphology and tested for embryonic/adult fast myosin heavy chain (MHC) expression. Immunocytochemistry with the anti-MHC antibody revealed the existence of distinct temporal differentiation patterns between MDC that differed by

their size. FR5 MDC were poorly differentiated, as can be seen by the presence of only a few thin myosin heavy chain\* cells after 7 days, whereas FR9 SC rapidly expressed this MHC isoform (observed over 3 days) and displayed a strong ability to form large and multinucleated myotubes in the following days. Bars 15 µm

Table 3 Differentiation ability of elutriated fraction-derived MDC

Cell fraction	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
Percentage o	f ventri	cular M	IHC+ M	DC			
FR5	None	None	None	5	20	30	40
FR7	None	1	20	30	70	70	80
FR9	<1	5	30	40	80	80	80
Percentage of	fembr	yonic/ac	fult fast	MHC+	MDC		
FR5	None	None	None	None	<1	3	5
FR7	None	2	2	5	20	50	70
FR9	1	2	10	10	40	60	70

Cells from each elutriated fraction were seeded in primary culture and examined daily with regard to their expression pattern for two myosin heavy chain (MHC) isoforms, ventricular MHC and embryonic/adult fast MHC. The percentage of positive cells was determined daily by counting at least 200 cells in each culture

all FR5 MDC were mononucleated and round-shaped. Two days later, FR5-derived cultures displayed some fusiform cells but without MHC isoform expression. A few FR5 MDC started to fuse together at day 5. Only 20% and less than 1% of them were slightly positive for ventricular and fast embryonic/adult MHC isoforms, respectively. At day 7, FR5 MDC showed some syncytia but without any tubular form. Moreover, ventricular and fast embryonic/adult MHC isoform positive cells represented only 40 and 5% of the cells, respectively.

Finally, FR5 MDC appeared to have weak differentiation ability compared to larger MDC. The difference observed between FR7 and FR9 cells was the capacity of the latter to rapidly fuse together and form multinucleated myotubes. As already mentioned in relation to proliferation ability, FR9 SC displayed more pronounced differentiation properties than those described for FR7 SC.

These data were consistent with those obtained on the phenotypic characterisation, supporting the hypothesis that FR5 MDC have a limited myogenic potential, while FR7 and FR9 cells corresponded to SC that could be distinguished by their myogenic commitment.

Electron microscopy of elutriated muscle-derived cells

To investigate whether the differential proliferation/ differentiation behaviour observed in vitro between the MDC could be associated with distinct ultrastructural features, cells of each elutriated fraction were analysed by electron microscopy.

Qualitative observations

Qualitative ultrastructural analysis revealed three morphological differences between the MDC separated by CCE (Fig. 4): (1) the cytoplasm was abundant in FR9 SC; (2) the cytoplasmic organelle density was low in FR5 MDC and particularly high in FR9 SC; and (3) the degree of cellular membrane



invagination was most pronounced in FR9 SC. Furthermore, all cells displayed a round to ellipsoid shape and a round-shaped nucleus, with a high percentage of euchromatin. Nuclei were centrally located in the cytoplasm. Single prominent nucleoli were often observed in the nucleus. Within the cytoplasm, no obvious polarisation of the organelles was observed. Oval or elongated mitochondria could be found with few cristae and clear or more condensed matrices. The Golgi apparatus was seldom observed and was found in the close vicinity of the nucleus. Lipid droplets were occasionally observed. Microtubules and microfilaments were often observed. In contrast, centrioles were rarely seen.

## Quantitative evaluation

Ultrastructural analysis of 100 cells randomly selected from the three fractions revealed statistically significant differences concerning (1) the cell shape coefficient ( $Q_{\circ}$ ) and the degree of cell membrane invagination; (2) the nuclear surface area (Sa<sub>n</sub>) and the nucleo-cytoplasmic ratio; and (3) the cytoplasmic organelle density. Concerning the mitochondria, their number was independent of the MDC size and was  $1.1\pm0.7$  mitochondria per  $10~\mu m^2$ .

Cell shape coefficient  $(Q_o)$  and degree of cell membrane invagination

FR5 and FR7 MDC were round ( $Q_c$ :  $0.86\pm0.09$  and  $0.88\pm0.07$ , respectively) with very few membrane invaginations (ratio of theoretical circumferences to measured ones (Pt/Pm):  $0.93\pm0.05$  and  $0.94\pm0.04$ , respectively). FR5 and FR7 MDC were statistically distinct from FR9 SC, which were more ellipsoid ( $Q_c$ :  $0.80\pm0.15$ ) and had a more folded cell membrane (Pt/Pm:  $0.89\pm0.09$ ) (P<0.05). The shape of the nucleus was not dependent on cell size. Nuclei were always ellipsoid ( $Q_n$  remained constant for all cells:  $0.80\pm0.16$ ) and

showed very few membrane invaginations (Pt/Pm: 0.90±0.09).

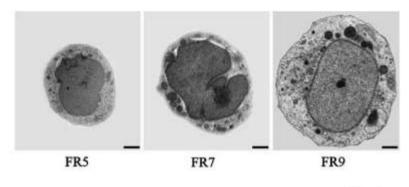
Nuclear surface area  $(Sa_n)$  and the nucleo-cytoplasmic ratio

In FR5, FR7 and FR9, the mean  $Sa_n$  of MDC was  $9.0\pm3.2$ ,  $18.3\pm4.4$  and  $17.6\pm5.8\,\mu\text{m}^2$ , respectively (Fig. 5a).  $Sa_n$  was smaller in FR5 MDC than in FR7 and FR9 SC (P<0.0001). The nucleo-cytoplasmic ratio was  $0.45\pm0.13$  (FR5 MDC),  $0.49\pm0.11$  (FR7 SC) and  $0.28\pm0.10$  (FR9 SC) (Fig. 5b). FR9 SC were characterised by a nucleo-cytoplasmic ratio that was much smaller compared to the one observed in MDC of the two other fractions (P<0.0001). These results indicated that the nucleus size of FR7 SC increased in proportion to their cytoplasm and, moreover, that FR9 SC displayed a considerable development of their cytoplasm compared to the cytoplasm observed in FR7 SC.

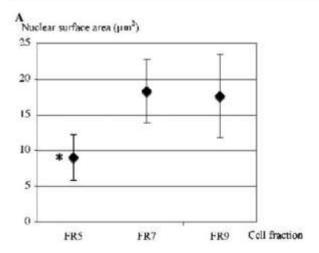
Rough endoplasmic reticulum, micropinocytotic vesicles and lipid droplet cytoplasmic density

Cellular organelles observed in the different MDC fractions were ranked according to the frequency and extent of their appearance. Different proportions of rough endoplasmic reticulum and micropinocytotic vesicles were detected with an organelle density that increased in proportion to the cell size (Table 4). Concerning rough endoplasmic reticulum cytoplasmic density, no FR5 MDC were categorised with a +++, compared to more than 57% of FR9 SC. Only 5.3% of FR7 SC occasionally displayed such organelle density. Similarly, 97.7 and 73.7% of FR5 and FR7 MDC showed just a few (+) micropinocytotic vesicles, respectively. In contrast, 63.2% of FR9 SC were categorised with a +++. Cytoplasmic lipid droplets were rarely observed in MDC and did not appear to be as affected by the cell size as the rough endoplasmic reticulum and micropinocytotic vesicles. 36.8% of

Fig. 4 MDC ultrastructural observation. All cells were characterised by round to ellipsoid shapes and predominant euchromatin. FR9 SC appeared distinct from those of FR5 and FR7 with lower nucleo-cytoplasmic ratio and higher cytoplasmic organelle density. Bars 1 μm









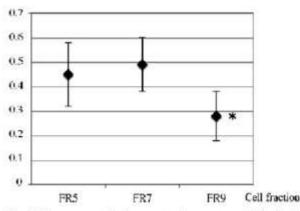


Fig. 5 Measurement of ultrastructural parameters of elutriated fraction-derived MDC. After elutriation, 100 cells were randomly selected from each fraction, and their nuclear surface area (a) and cell surface area were measured to determine their respective nucleo-cytoplasmic ratio (b). Results were expressed as a mean value, and error bars represented SD values. Data were analysed by a Fisher PLSD test, and data with P values <0.0001 were identified by a single asterisk. FR5 MDC showed a nuclear surface that was smaller than that of FR7- and FR9-derived SC. It also appeared that the nucleo-cytoplasmic ratio of FR9 SC was much lower than that of the other MDC.

FR9 SC were categorised with a ++, compared to 11.6 and 15.8% of FR5 and FR7, respectively. The cytoplasmic organelle density of FR9 SC was much greater than that of the other cells (P<0.001), especially for rough endoplasmic reticulum and micropinocytotic vesicles. Moreover, FR5 MDC appeared as cells with very few cytoplasmic organelles, indicative of cells with low metabolic activity.

Altogether, these ultrastructural results showed that the three MDC types initially defined by their

Table 4 MDC cytoplasmic organelle density. One hundred cells were analysed by electron microscopy, and cellular organelles were ranked according to the frequency and extent of their appearance. Each organelle was described as not observed (-), rarely (+), occasionally (++) and frequently (+++) observed

Cytoplasmic organelle density	Cell fraction (%)		
	FR5	FR7	FR9
Rough endoplasmic reticulum			
10 j	None	None	None
+:	95.3	68.4	15.8
++	4.7	26.3	26.3
+++	None	5.3	57.9
Micropinocytotic vesicles			
STANDARD CONTRACTOR CONTRACTOR	None	None	None
+	97.7	73.7	15.8
++	2.3	23.7	21.0
+++	None	2.6	63.2
Lipid droplets			
T80 20	39.6	26.3	5.3
+	48.8	57.9	57.9
++	11.6	15.8	36.8
+++	None	None	None

different sizes corresponded to cells with distinct morphological features characteristic of specific metabolic status.

## Discussion

In the present paper, we aimed at determining if the morphometric characteristics of freshly extracted MDC could be indicative of a distinctive criterion that would make it possible to distinguish between them. We also attempted to investigate whether or not their size was associated with specific behavioural features, and to what extent this structural criterion could be used to separate the MDC with specific properties, as soon as they are extracted from muscle tissue. Morphometric analysis initially revealed that MDC displayed a wide range of sizes. Assessment of myogenic marker expression performed on three representative cell fractions obtained by CCE showed that this cell size diversity was associated with the myogenic commitment level of the MDC. We demonstrated in vitro that the smallest MDC exhibited limited myogenic activity while larger MDC displayed a myogenic potential increasing with their size. Electron microscopy investigations revealed that the smallest MDC presented many features indicative of a quiescent status except the presence of euchromatin, whereas the other MDC have morphological forms characteristic of differential metabolic activities that increased as a function of cell size. To our knowledge, our data is the



first description of a direct relationship between the size of freshly extracted MDC and their respective progression towards myogenic differentiation lineage. Collectively, these findings reveal that this structural criterion could be useful to separate more or less committed cells in the myogenic programme at an early stage.

In our study, we observed that freshly extracted MDC displayed a broad and continuous size scale with more than 65% of the cells having a diameter of between 5.5 and 7.5 µm, but also with extreme values that were separated by more than a twofold factor. These findings were consistent with in situ morphometric analyses indicating that SC isolated from different muscle types were highly heterogeneous in terms of size, with a range of 18-50 µm (Campion 1984). However, in our experiments, MDC were only extracted from the Pectoralis superficialis, a pure fast twitch muscle, revealing that this heterogeneous character was also present within one identified skeletal muscle and can therefore not be attributed to the biochemical type of the muscle (fast or slow muscle) (Baranska et al. 1997). In this case, our ultrastructural analysis showed that while SC with sizes exceeding 7.5 µm presented abundant cytoplasm with an increased density of rough endoplasmic reticulum and vesicles, the smallest cells were defined by small nuclei and low cytoplasmic organelle density. Such quantitative differences have been documented according to the age and sex of the animals used for the studies (Schultz 1976; Snow 1977). However, the SC in our study all derived from the same group of 7-day-old male animals. In return, the activation level of the cells could explain such differences. SC activation is defined as the process by which cells exit Go and enter the cell cycle. Indeed, several electron microscopic studies showed that activated SC are characterised by an increased number of pinocytotic vesicles, ribosomes, Golgi apparatus and rough endoplasmic reticulum, as well as a high percentage of euchromatin and an expanded cytoplasm (Campion et al. 1981; Schultz and McCormick 1994; Roth et al. 2000). Therefore, smaller cells that displayed many ultrastructural features characteristic of low metabolic activity may be cells in a quiescent state. The presence of euchromatin on these cells may be explained by the fact that they are just exiting Go, due to the cell isolation procedure. Indeed, muscle explant and the standard isolation protocol based on mechanic and enzymatic dissociation have been shown to activate SC to reenter the cell cycle (Bischoff 1986; Cornelison and Wold 1997). In contrast, cells defined by their greater size could be metabolically active. This was corroborated by our in vitro analysis that revealed that the latter SC displayed clear-cut myogenic specification, whereas the other ones had little ability to proliferate and differentiate. Based on these results, many parallels can be established with previous studies that revealed behavioural heterogeneity of the SC (Molnar et al. 1996; Schultz 1996; Lagord et al. 1998). For example, FR5 SC could contain poorly proliferating SC, identified as those responsible for maintaining the pool, compared to the others that rapidly differentiate (Rantanen et al. 1995). They could be assimilated with the minority of cells observed in a clonal study and that remained undifferentiated when cultured under conditions designed to induce differentiation (Baroffio et al. 1996).

How can we explain the existence of SC with divergent myogenic commitment? Is it due to different responsiveness to the microenvironment/stimuli, allowing subsequent activation, or to the distinct nature of cells within the cascade of myogenic lineage? Firstly, the different levels of activity observed between FR5 MDC that display poor myogenic potential and the others that give rise to myoblasts could be indicative of cell sub-populations that do not have the same myogenic inductive mechanisms. Heterogeneity of SC in relation to their response to environmental stimuli has been demonstrated by identification of sub-populations that displayed differential sensitivity to growth factor requirements for proliferation (Yablonka-Reuveni and Rivera 1994; McFarland et al. 1995) or irradiation (Heslop et al. 2000). It is interesting to observe that SC selected for fast and slow rates of proliferation have been shown to be heterogeneous for their responsiveness to the hepatocyte growth factor (HGF) (Zeng et al. 2002). HGF is the first growth factor reported to activate quiescent SC through interaction with the c-met receptor (Cornelison and Wold 1997) and cause them to enter the cell cycle (Allen et al. 1995; Tatsumi et al. 1998). We could speculate that FR5 MDC have a lower sensitivity towards environmental stimuli due to the weak affinity of their receptors for factors involved in the activation process such as HGF and/or a small number of these receptors. They may then not be sufficiently stimulated by isolation procedures and culture conditions, and may require additional or more specific signals to undergo myogenesis and finally form myoblasts.

Secondly, the different fates of MDC could reflect the different nature of the cells that we initially isolated, based on their size. Pax7 was reported to play an essential role in SC biogenesis by restricting alternate developmental programmes (Seale et al. 2000; Oustanina et al. 2004). This paired-box transcription factor was expressed in both quiescent and activated SC, as



well as in proliferating primary myoblast, but was inhibited after myogenic differentiation (Rudnicki et al. 1993; Seale et al. 2000; Halevy et al. 2004). In our study, we showed that nearly all FR7 and FR9 MDC corresponded to SC that only differed by their myogenic stage, with FR9 that contained pre-differentiating cell fractions. In contrast, FR5 MDC initially displayed a small fraction of cells expressing Pax7 (3%) or M-cadherin (17%). Recent studies reported a differential expression for both of these myogenic markers in quiescent SC. Indeed, Pax7 protein was shown to be undetectable in 30% of mouse SC associated with freshly harvested myofibres (Olguin and Olwin 2004) and less than 20% of quiescent SC were detectably M-cadherin at the earliest post-extraction time (Cornelison and Wold 1997). Consistent with our results showing a higher percentage of M-cadherin+ cells than Pax7+ cells, Reimann et al. (2004) demonstrated that almost 6% of M-cadherin+ SC were negative for Pax7. Therefore, although freshly extracted FR5 MDC faintly expressed Pax7 and M-cadherin, we could not exclude the hypothesis that FR5, which represented 10% of all MDC, was composed of quiescent SC. Another possibility was that this fraction was enriched in progenitor cells. Indeed, it was recently demonstrated that musclederived side population (SP) cells, a small fraction of adult stem cells purified by using Hoechst 33342 staining/FACS methods, were smaller compared with non-SP cells and displayed many characteristics of cells with low metabolic activity, similar to an endoplasmic reticulum with very few ribosomes (Benchaouir et al. 2004). It is interesting to note that as described for FR5 MDC and the other SC, SP and non-SP cells behaved differently in vitro. While non-SP cells were fully differentiated into myotubes after 1 week once they reached confluence, SP cells mainly remained mononuclear with a spherical shape and exhibited delayed muscle differentiation with a consistently small number of myotubes compared to non-SP cultures (Gussoni et al. 1999; Benchaouir et al. 2004). Consistent with this idea, our results on the evolution over time of cell proliferation showed that FR5 MDC were characterised by constant poor proliferation ability and could be defined as 'dormant' cells. It is also intriguing to note that a cellcycle analysis showed that freshly isolated SP cells were predominantly in the Go/G1 phase (Benchaouir et al. 2004). Moreover, as specifically demonstrated here for FR5 MDC after 1 day in culture medium, the SP cells were consistently found to be round, whereas the non-SP population contained predominantly spindle-shaped cells (Majka et al. 2003), as described for FR7 and FR9 SC. Finally, SP cells appeared to be less adherent to the substrate than non-SP cells that mainly

contained immediate adherent cells (Benchaouir et al. 2004). This reduced adhesion ability is currently used to isolate muscle-derived stem cells (Jankowski et al. 2001). Along the same lines, we noted that no clonally derived colony has yet to be identified from FR5 cells in clonal cultures. As already mentioned in Results section, this could reflect a pronounced fragility of these cells, but it is also possible that FR5 cells exhibiting reduced adhesion to plastic were eliminated when cell medium was changed after 2 days. Thus, it is tempting to speculate that the cell isolation procedure based on cell size allowed us to separate cells that differed with respect to their myogenic commitment into a population enriched in early muscle precursor cells or progenitor cells that could allow self-renewal of the SC population and a population of activated SC and fully committed myoblasts.

In conclusion, our results globally demonstrated that the size of freshly extracted MDC is highly variable and indicative of their respective progression towards myogenic differentiation lineage. This structural criterion may provide a useful tool for separating myogenic cells with distinct commitment levels and isolating immature progenitor cells of SC, at an early stage. Further experiments are required to determine the induction modalities of the smaller MDC in the myogenic programme that could help us to have a broader view of the cellular regulation of the muscle regeneration process.

Acknowledgements The authors would like to thank P. Guyot for assistance with animal care and facilities. We are grateful to E. Bandman, T. Jaffredo and PY. Rescan for generously supplying antibodies (MHC, QH1 and M-cadherin, respectively). We would also like to thank R. Primault and MT. Lavault for their technical assistance. The monoclonal antibody specific for Pax7 developed here by us was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by the University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242. This work was supported by a grant from the "Association Française contre les Myopathies (AFM)".

## References

Allen RE, Sheehan SM, Taylor RG, Kendall TL, Rice GM (1995) Hepatocyte growth factor activates quiescent skeletal muscle satellite cells in vitro, J Cell Physiol 165:307-312

Bandman E, Bennett T (1988) Diversity of fast myosin heavy chain expression during development of gastrocnemius, bicep brachii, and posterior latissimus dorsi muscles in normal and dystrophic chickens. Dev Biol 130:220–231

Bandman E, Bourke DL, Wick M (1990) Regulation of myosin heavy chain expression during development, maturation, and regeneration in avian muscles: the role of myogenic and non-myogenic factors. In: Gruyter WD (ed) The dynamic state of muscle fibers, D Pette, Berlin, pp 127–138



- Baranska W, Baran W, Skopinski P, Ziemba H (1997) Morphometric analysis of satellite cells in rat skeletal muscles: soleus and extensor digitorum longus. Acta Anat (Basel) 160:88–94
- Baroflio A, Hamann M, Bernheim L, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Bader CR (1996) Identification of self-renewing myoblasts in the progeny of single human muscle satellite cells. Differentiation 60:47–57
- Benchaouir R, Rameau P, Decraene C, Dreyfus P, Israeli D, Pietu G, Danos O, Garcia L (2004) Evidence for a resident subset of cells with SP phenotype in the C2C12 myogenic line: a tool to explore muscle stem cell biology. Exp Cell Res 294:254–268
- Bischoff R (1986) Proliferation of muscle satellite cells on intact myofibers in culture. Dev Biol 115:129-139
- Campion DR (1984) The muscle satellite cell: a review. Int Rev Cytol 87:225–251
- Campion DR, Richardson RL, Reagan JO, Kraeling RR (1981) Changes in the satellite cell population during postnatal growth of pig skeletal muscle. J Anim Sci 52:1014–1018
- Cerny LC, Bandman E (1987) Expression of myosin heavy chain isoforms in regenerating myotubes of innervated and denervated chicken pectoral muscle. Dev Biol 119:350–362
- Cornelison DD, Wold BJ (1997) Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. Dev Biol 191:270–283
- Cossu G, Molinaro M (1987) Cell heterogeneity in the myogenic lineage, Curr Top Dev Biol 23:185–208
- Darr KC, Schultz E (1987) Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle. J Appl Physiol 63:1816–1821
- Gibson MC, Schultz E (1983) Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells. Muscle Nerve 6:574–580
- Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC (1999) Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. Nature 401:390–394
- Halevy O, Piestun Y, Allouh MZ, Rosser BW, Rinkevich Y, Reshef R, Rozenboim I, Wleklinski-Lee M, Yablonka-Reuveni Z (2004) Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal. Dev Dyn 231:489–502
- Hansel TT, De Vries IJ, Iff T, Rihs S, Wandzilak M, Betz S, Blaser K, Walker C (1991) An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. J Immunol Methods 145:105–110
- Heslop L, Morgan JE, Partridge TA (2000) Evidence for a myogenic stem cell that is exhausted in dystrophic muscle. J Cell Sci 113(Pt 12):2299–2308
- Irintchev A, Zeschnigk M, Starzinski-Powitz A, Wernig A (1994)
  Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles. Dev Dyn 199:326–337
- Jankowski RJ, Haluszczak C, Trucco M, Huard J (2001) Flow cytometric characterization of myogenic cell populations obtained via the preplate technique: potential for rapid isolation of muscle-derived stem cells. Hum Gene Ther 12:619–628
- Lagord C, Soulet L, Bonavaud S, Bassaglia Y, Rey C, Barlovatz-Meimon G, Gautron J, Martelly I (1998) Differential myogenicity of satellite cells isolated from extensor digitorum longus (EDL) and soleus rat muscles revealed in vitro. Cell Tissue Res 291:455–468
- Majka SM, Jackson KA, Kienstra KA, Majesky MW, Goodell MA, Hirschi KK (2003) Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration. J Clin Invest 111:71–79

- Maruyama K, Kanemaki N (1991) Myosin isoform expression in skeletal muscles of turkeys at various ages. Poult Sci 70:1748-1757
- Mauro A (1961) Satellite cell of skeletal muscle fibers. J Biophys Biochem Cytol 9:493–495
- McFarland DC, Pesall JE, Gilkerson KK (1993) The influence of growth factors on turkey embryonic myoblasts and satellite cells in vitro. Gen Comp Endocrinol 89:415–424
- McFarland DC, Pesall JE, Gilkerson KK, Ferrin NH (1995) The response to growth factors of cultured satellite cells derived from turkeys having different growth rates. Cytobios 82:229– 238.
- Molnar G, Ho ML, Schroedl NA (1996) Evidence for multiple satellite cell populations and a non-myogenic cell type that is regulated differently in regenerating and growing skeletal muscle. Tissue Cell 28:547-556
- Moore R, Walsh FS (1993) The cell adhesion molecule M-cadherin is specifically expressed in developing and regenerating, but not denervated skeletal muscle. Development 117:1409–1420
- Moss FP, Leblond CP (1970) Nature of dividing nuclei in skeletal muscle of growing rats. J Cell Biol 44:459–462
- Olguin HC, Olwin BB (2004) Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. Dev Biol 275:375–388
- Oustanina S, Hause G, Braun T (2004) Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. Embo J 23:3430–3439
- Pardanaud L, Altmann C, Kitos P, Dieterlen-Lievre F, Buck CA (1987) Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. Development 100:339–349
- Rantanen J, Hurme T, Lukka R, Heino J, Kalimo H (1995) Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. Lab Invest 72:341–347
- Reimann J, Brimah K, Schroder R, Wernig A, Beauchamp JR, Partridge TA (2004) Pax7 distribution in human skeletal muscle biopsies and myogenic tissue cultures. Cell Tissue Res 315:233–242
- Roth SM, Martel GF, Ivey FM, Lemmer JT, Metter EJ, Hurley BF, Rogers MA (2000) Skeletal muscle satellite cell populations in healthy young and older men and women. Anat Rec 260:351–358
- Rouger K, Brault M, Daval N, Leroux I, Guigand L, Lesoeur J, Fernandez B, Cherel Y (2004) Muscle satellite cell heterogeneity: in vitro and in vivo evidences for populations that fuse differently. Cell Tissue Res 317:319–326
- Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R (1993) MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle, Cell 75:1351–1359
- Schultz E (1976) Fine structure of satellite cells in growing skeletal muscle. Am J Anat 147:49–70
- Schultz E (1996) Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. Dev Biol 175:84–94
- Schultz E, Jaryszak DL (1985) Effects of skeletal muscle regeneration on the proliferation potential of satellite cells. Mech Ageing Dev 30:63–72
- Schultz E, Lipton BH (1982) Skeletal muscle satellite cells: changes in proliferation potential as a function of age. Mech Ageing Dev 20:377–383
- Schultz E, McCormick KM (1994) Skeletal muscle satellite cells. Rev Physiol Biochem Pharmacol 123:213–257
- Schultz E, Gibson MC, Champion T (1978) Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. J Exp Zool 206:451–456



- Seale P, Rudnicki MA (2000) A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. Dev Biol 218:115–124
- Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA (2000) Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. Cell 102:777–786
- Snow MH (1977) The effects of aging on satellite cells in skeletal muscles of mice and rats. Cell Tissue Res 185:399–408
- Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE (1998) HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. Dev Biol 194:114– 128
- Watkins SC, Cullen MJ (1986) A quantitative comparison of satellite cell ultrastructure in Duchenne muscular dystrophy, polymyositis, and normal controls. Muscle Nerve 9:724–730

- Watt DJ, Karasinski J, Moss J, England MA (1994) Migration of muscle cells. Nature 368:406–407
- Wilkie RS, O'Neill IE, Butterwith SC, Duclos MJ, Goddard C (1995) Regulation of chick muscle satellite cells by fibroblast growth factors: interaction with insulin-like growth factor-I and heparin. Growth Regul 5:18–27
- Yablonka-Reuveni Z (1995) Development and postnatal regulation of adult myoblasts. Microse Res Tech 30:366–380
- Yablonka-Reuveni Z, Rivera AJ (1994) Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. Dev Biol 164:588–603
- Zeng C, Pesall JE, Gilkerson KK, McFarland DC (2002) The effect of hepatocyte growth factor on turkey satellite cell proliferation and differentiation. Poult Sci 81:1191–1198



## **Bibliographie**

## **Bibliographie**

- Acsadi, G., Dickson, G., Love, D. R., Jani, A., Walsh, F. S., Gurusinghe, A., Wolff, J. A. and Davies, K. E. (1991). Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature* 352, 815-8.
- **Aggarwal, S. and Pittenger, M. F.** (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**, 1815-22.
- **Ahn, A. H. and Kunkel, L. M.** (1993). The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet* **3**, 283-91.
- Al Attar, N., Carrion, C., Ghostine, S., Garcin, I., Vilquin, J. T., Hagege, A. A. and Menasche, P. (2003). Long-term (1 year) functional and histological results of autologous skeletal muscle cells transplantation in rat. *Cardiovasc Res* 58, 142-8.
- **Allamand, V. and Campbell, K. P.** (2000). Animal models for muscular dystrophy: valuable tools for the development of therapies. *Hum Mol Genet* **9**, 2459-67.
- Alliot-Licht, B., Bluteau, G., Magne, D., Lopez-Cazaux, S., Lieubeau, B., Daculsi, G. and Guicheux, J. (2005). Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. *Cell Tissue Res* **321**, 391-400.
- **Amann, K. J., Guo, A. W. and Ervasti, J. M.** (1999). Utrophin lacks the rod domain actin binding activity of dystrophin. *J Biol Chem* **274**, 35375-80.
- Anderson, J. T., Rogers, R. P. and Jarrett, H. W. (1996). Ca2+-calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin. *J Biol Chem* **271**, 6605-10.
- Andreeva, E. R., Pugach, I. M., Gordon, D. and Orekhov, A. N. (1998). Continuous subendothelial network formed by pericyte-like cells in human vascular bed. *Tissue Cell* **30**, 127-35.
- **Appell, H. J., Forsberg, S. and Hollmann, W.** (1988). Satellite cell activation in human skeletal muscle after training: evidence for muscle fiber neoformation. *Int J Sports Med* **9**, 297-9.
- Arakawa, M., Shiozuka, M., Nakayama, Y., Hara, T., Hamada, M., Kondo, S., Ikeda, D., Takahashi, Y., Sawa, R., Nonomura, Y. et al. (2003). Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of mdx mice. *J Biochem (Tokyo)* 134, 751-8.
- **Armand, O., Boutineau, A. M., Mauger, A., Pautou, M. P. and Kieny, M.** (1983). Origin of satellite cells in avian skeletal muscles. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* **72**, 163-81.
  - Asakura, A. (2003). Stem cells in adult skeletal muscle. Trends Cardiovasc Med 13, 123-8.
- **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**, 123-34.
- Athanasopoulos, T., Graham, I. R., Foster, H. and Dickson, G. (2004). Recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors as therapeutic tools for Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Gene Ther* 11 Suppl 1, S109-21.
- Bachrach, E., Li, S., Perez, A. L., Schienda, J., Liadaki, K., Volinski, J., Flint, A., Chamberlain, J. and Kunkel, L. M. (2004). Systemic delivery of human microdystrophin to regenerating mouse dystrophic muscle by muscle progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3581-6.
- Bachrach, E., Perez, A. L., Choi, Y. H., Illigens, B. M., 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.
- **Baharvand, H. and Matthaei, K. I.** (2003). The ultrastructure of mouse embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online* **7**, 330-5.
- **Bandman, E. and Bennett, T.** (1988). Diversity of fast myosin heavy chain expression during development of gastrocnemius, bicep brachii, and posterior latissimus dorsi muscles in normal and dystrophic chickens. *Dev Biol* **130**, 220-31.

- **Bandman, E., Bourke, D. L. and Wick, M.** (1990). Regulation of myosin heavy chain expression during development, maturation, and regeneration in avian muscles: The role of myogenic and non-myogenic factors. In *The dynamic state of muscle fibers. D. Pette*, (ed. W. d. Gruyter), pp. 127-138. Berlin.
- **Baranska, W., Baran, W., Skopinski, P. and Ziemba, H.** (1997). Morphometric analysis of satellite cells in rat skeletal muscles: soleus and extensor digitorum longus. *Acta Anat (Basel)* **160**, 88-94.
- Barbujani, G., Russo, A., Danieli, G. A., Spiegler, A. W., Borkowska, J. and Petrusewicz, I. H. (1990). Segregation analysis of 1885 DMD families: significant departure from the expected proportion of sporadic cases. *Hum Genet* 84, 522-6.
- **Barker, J. N. and Wagner, J. E.** (2003). Umbilical cord blood transplantation: current practice and future innovations. *Crit Rev Oncol Hematol* **48**, 35-43.
- **Barnett, J. G., Holly, R. G. and Ashmore, C. R.** (1980). Stretch-induced growth in chicken wing muscles: biochemical and morphological characterization. *Am J Physiol* **239**, C39-46.
- Baroffio, A., Hamann, M., Bernheim, L., Bochaton-Piallat, M. L., Gabbiani, G. and Bader, C. R. (1996). Identification of self-renewing myoblasts in the progeny of single human muscle satellite cells. *Differentiation* **60**, 47-57.
- **Barry, F. P. and Murphy, J. M.** (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 568-84.
- Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R. et al. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 30, 42-8.
- Bartlett, R. J., Winand, N. J., Secore, S. L., Singer, J. T., Fletcher, S., Wilton, S., Bogan, D. J., Metcalf-Bogan, J. R., Bartlett, W. T., Howell, J. M. et al. (1996). Mutation segregation and rapid carrier detection of X-linked muscular dystrophy in dogs. *Am J Vet Res* 57, 650-4.
- Barton-Davis, E. R., Cordier, L., Shoturma, D. I., Leland, S. E. and Sweeney, H. L. (1999). Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest* **104**, 375-81.
- Beauchamp, J. R., Heslop, L., Yu, D. S., Tajbakhsh, S., Kelly, R. G., Wernig, A., Buckingham, M. E., Partridge, T. A. and Zammit, P. S. (2000). Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol* 151, 1221-34.
- **Beauchamp, J. R., Morgan, J. E., Pagel, C. N. and Partridge, T. A.** (1999). Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J Cell Biol* **144**, 1113-22.
- **Becker, P. E. and Kiener, F.** (1955). [A new x-chromosomal muscular dystrophy.]. *Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr* **193**, 427-48.
- Beenakker, E. A., 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, 639-42.
- **Ben-Yair, R. and Kalcheim, C.** (2005). Lineage analysis of the avian dermomyotome sheet reveals the existence of single cells with both dermal and muscle progenitor fates. *Development* **132**, 689-701.
- **Benabdallah, B. F., Bouchentouf, M. and Tremblay, J. P.** (2005). Improved success of myoblast transplantation in mdx mice by blocking the myostatin signal. *Transplantation* **79**, 1696-702.
- Benchaouir, R., Rameau, P., Decraene, C., Dreyfus, P., Israeli, D., Pietu, G., Danos, O. and Garcia, L. (2004). Evidence for a resident subset of cells with SP phenotype in the C2C12 myogenic line: a tool to explore muscle stem cell biology. *Exp Cell Res* **294**, 254-68.
- **Betsholtz, C., Lindblom, P. and Gerhardt, H.** (2005). Role of pericytes in vascular morphogenesis. *Exs*, 115-25.

- **Bhatia, M., Bonnet, D., Murdoch, B., Gan, O. I. and Dick, J. E.** (1998). A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med* **4**, 1038-45.
- **Bianco, P. and Gehron Robey, P.** (2000). Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* **105**, 1663-8.
- **Bischoff, R. and Heintz, C.** (1994). Enhancement of skeletal muscle regeneration. *Dev Dyn* **201**, 41-54.
- Blake, D. J., Nawrotzki, R., Loh, N. Y., Gorecki, D. C. and Davies, K. E. (1998). beta-dystrobrevin, a member of the dystrophin-related protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 241-6.
- Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E. and Davies, K. E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* 82, 291-329.
- **Blasi, F., Stoppelli, M. P. and Cubellis, M. V.** (1986). The receptor for urokinase-plasminogen activator. *J Cell Biochem* **32**, 179-86.
- **Bobet, J., Mooney, R. F. and Gordon, T.** (1998). Force and stiffness of old dystrophic (mdx) mouse skeletal muscles. *Muscle Nerve* **21**, 536-9.
- Bogdanovich, S., Krag, T. O., 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**, 418-21.
- **Bogdanovich, S., Perkins, K. J., Krag, T. O. and Khurana, T. S.** (2004). Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. *J Mol Med* **82**, 102-15.
- Bonilla, E., Samitt, C. E., Miranda, A. F., Hays, A. P., Salviati, G., DiMauro, S., Kunkel, L. M., Hoffman, E. P. and Rowland, L. P. (1988a). Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell* **54**, 447-52.
- Bonilla, E., Schmidt, B., Samitt, C. E., Miranda, A. F., Hays, A. P., de Oliveira, A. B., Chang, H. W., Servidei, S., Ricci, E., Younger, D. S. et al. (1988b). Normal and dystrophindeficient muscle fibers in carriers of the gene for Duchenne muscular dystrophy. *Am J Pathol* 133, 440-5.
- **Booth, C. and Potten, C. S.** (2000). Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J Clin Invest* **105**, 1493-9.
- Bouchentouf, M., Benabdallah, B. F., Mills, P. and Tremblay, J. P. (2006). Exercise improves the success of myoblast transplantation in mdx mice. *Neuromuscul Disord* **16**, 518-29.
- **Boulanger, A., Asselin, I., Roy, R. and Tremblay, J. P.** (1997). Role of non-major histocompatibility complex antigens in the rejection of transplanted myoblasts. *Transplantation* **63**, 893-9.
- **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**, 1276-80.
- **Brack, A. S., Bildsoe, H. and Hughes, S. M.** (2005). Evidence that satellite cell decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy. *J Cell Sci* **118**, 4813-21.
- **Braun, S.** (2004). Naked plasmid DNA for the treatment of muscular dystrophy. *Curr Opin Mol Ther* **6**, 499-505.
- Breems, D. A., Blokland, E. A., Neben, S. and Ploemacher, R. E. (1994). Frequency analysis of human primitive haematopoietic stem cell subsets using a cobblestone area forming cell assay. *Leukemia* **8**, 1095-104.
- **Buckingham, M. and Tajbakhsh, S.** (1993). Expression of myogenic factors in the mouse: myf-5, the first member of the MyoD gene family to be transcribed during skeletal myogenesis. *C R Acad Sci III* **316**, 1032-46.
- **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**, 1189-92.
- **Bunting, K. D.** (2002). ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells* **20**, 11-20.

- **Bushby, K. M., Hill, A. and Steele, J. G.** (1999). Failure of early diagnosis in symptomatic Duchenne muscular dystrophy. *Lancet* **353**, 557-8.
  - Campion, D. R. (1984). The muscle satellite cell: a review. Int Rev Cytol 87, 225-51.
- **Carlson, B. M. and Faulkner, J. A.** (1983). The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review. *Med Sci Sports Exerc* **15**, 187-98.
- 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., McAfee, M. B. et al. (1989). Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency. *Am J Pathol* **135**, 909-19.
- Chamberlain, J. S., Corrado, K., Rafael, J. A., Cox, G. A., Hauser, M. and Lumeng, C. (1997). Interactions between dystrophin and the sarcolemma membrane. *Soc Gen Physiol Ser* **52**, 19-29.
- Chamberlain, J. S., Pearlman, J. A., Muzny, D. M., Gibbs, R. A., Ranier, J. E., Caskey, C. T. and Reeves, A. A. (1988). Expression of the murine Duchenne muscular dystrophy gene in muscle and brain. *Science* 239, 1416-8.
- **Charge, S. B. and Rudnicki, M. A.** (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* **84**, 209-38.
- **Chazaud, B., Christov, C., Gherardi, R. K. and Barlovatz-Meimon, G.** (1998). In vitro evaluation of human muscle satellite cell migration prior to fusion into myotubes. *J Muscle Res Cell Motil* **19**, 931-6.
- Cherel, Y., Hurtrel, M., Gardahaut, M. F., Merly, F., Magras-Resch, C., Fontaine-Perus, J. and Wyers, M. (1994). Comparison of postnatal development of anterior latissimus dorsi (ALD) muscle in heavy- and light-weight strains of turkey (Meleagris gallopavo). *Growth Dev Aging* **58**, 157-65.
- Childers, M. K., Okamura, C. S., Bogan, D. J., Bogan, J. R., Sullivan, M. J. and Kornegay, J. N. (2001). Myofiber injury and regeneration in a canine homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Am J Phys Med Rehabil* **80**, 175-81.
- **Clemens, P. R. and Duncan, F. J.** (2001). Progress in gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Curr Neurol Neurosci Rep* **1**, 89-96.
- Clerk, A., Morris, G. E., Dubowitz, V., Davies, K. E. and Sewry, C. A. (1993). Dystrophin-related protein, utrophin, in normal and dystrophic human fetal skeletal muscle. *Histochem J* 25, 554-61.
- **Collett, G. D. and Canfield, A. E.** (2005). Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circ Res* **96**, 930-8.
  - Collins, C. A. (2006). Satellite cell self-renewal. Curr Opin Pharmacol 6, 301-6.
- **Collins, C. A. and Morgan, J. E.** (2003). Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *Int J Exp Pathol* **84**, 165-72.
- 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.
- Colter, D. C., Class, R., DiGirolamo, C. M. and Prockop, D. J. (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3213-8.
- Conboy, I. M., Conboy, M. J., Smythe, G. M. and Rando, T. A. (2003). Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science* **302**, 1575-7.
- **Conboy, I. M. and Rando, T. A.** (2002). The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell* **3**, 397-409.
- Cornelison, D. D., Wilcox-Adelman, S. A., Goetinck, P. F., Rauvala, H., Rapraeger, A. C. and Olwin, B. B. (2004). Essential and separable roles for Syndecan-3 and Syndecan-4 in skeletal muscle development and regeneration. *Genes Dev* 18, 2231-6.
- **Cornelison, D. D. and Wold, B. J.** (1997). Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol* **191**, 270-83.

- Cosset, F. L., Legras, C., Chebloune, Y., Savatier, P., Thoraval, P., Thomas, J. L., Samarut, J., Nigon, V. M. and Verdier, G. (1990). A new avian leukosis virus-based packaging cell line that uses two separate transcomplementing helper genomes. *J Virol* 64, 1070-8.
- Cossu, G. and Molinaro, M. (1987). Cell heterogeneity in the myogenic lineage. *Curr Top Dev Biol* 23, 185-208.
- Cossu, G. and Tajbakhsh, S. (2007). Oriented cell divisions and muscle satellite cell heterogeneity. *Cell* 129, 859-61.
- Cossu, G., Tajbakhsh, S. and Buckingham, M. (1996). How is myogenesis initiated in the embryo? *Trends Genet* 12, 218-23.
- **Coulton, G. R., Morgan, J. E., Partridge, T. A. and Sloper, J. C.** (1988). The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol* **14**, 53-70.
- Courdier-Fruh, I., Barman, L., Briguet, A. and Meier, T. (2002). Glucocorticoid-mediated regulation of utrophin levels in human muscle fibers. *Neuromuscul Disord* 12 Suppl 1, S95-104.
- **Courdier-Fruh, I., Barman, L., Wettstein, P. and Meier, T.** (2003). Detection of glucocorticoid-like activity in traditional Chinese medicine used for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* **13**, 699-704.
- Cross, C. C. and Mercer, K. L. (1993). Muscle. In *Cell and tissue ultrastructure; A functional perspective*, (ed. W. H. F. a. Company), pp. 420. New York.
- Davies, K. E., Pearson, P. L., Harper, P. S., Murray, J. M., O'Brien, T., Sarfarazi, M. and Williamson, R. (1983). Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the Duchenne muscular dystrophy locus on the short arm of the human X chromosome. *Nucleic Acids Res* 11, 2303-12.
- **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**, 869-78.
- **De Bari, C., Dell'Accio, F., Vandenabeele, F., Vermeesch, J. R., Raymackers, J. M. and Luyten, F. P.** (2003). Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol* **160**, 909-18.
- de la Fuente, R., Abad, J. L., Garcia-Castro, J., Fernandez-Miguel, G., Petriz, J., Rubio, D., Vicario-Abejon, C., Guillen, P., Gonzalez, M. A. and Bernad, A. (2004). Dedifferentiated adult articular chondrocytes: a population of human multipotent primitive cells. *Exp Cell Res* **297**, 313-28.
- **De la Porte, S., Morin, S. and Koenig, J.** (1999). Characteristics of skeletal muscle in mdx mutant mice. *Int Rev Cytol* **191**, 99-148.
- **De Luca, A., Pierno, S., Liantonio, A., Cetrone, M., Camerino, C., Fraysse, B., Mirabella, M., Servidei, S., Ruegg, U. T. and Conte Camerino, D.** (2003). Enhanced dystrophic progression in mdx mice by exercise and beneficial effects of taurine and insulin-like growth factor-1. *J Pharmacol Exp Ther* **304**, 453-63.
- **Deans, R. J. and Moseley, A. B.** (2000). Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* **28**, 875-84.
- Deasy, B. M., Lu, A., Tebbets, J. C., Feduska, J. M., Schugar, R. C., Pollett, J. B., Sun, B., Urish, K. L., Gharaibeh, B. M., Cao, B. et al. (2007). A role for cell sex in stem cell-mediated skeletal muscle regeneration: female cells have higher muscle regeneration efficiency. *J Cell Biol* 177, 73-86.
- 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, 4311-8.

- 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, 255-67.
- Di Rocco, G., Iachininoto, M. G., Tritarelli, A., Straino, S., Zacheo, A., Germani, A., Crea, F. and Capogrossi, M. C. (2006). Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J Cell Sci* 119, 2945-52.
- **Domen, J., Wagers, A. and Weissman, I. L.** (2006). Bone marrow (hematopoietic) stem cells. In *Regenerative medicine* 2006, pp. 65: National Institute of Health.
- **Domen, J., Wagers, A., Weissman, I. L.,.** (2006). Regenerative Medicine 2006. In *CHAPTER 2: BONE MARROW (HEMATOPOIETIC) STEM CELLS*: NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH.
- Donati, C., Cencetti, F., Nincheri, P., Bernacchioni, C., Brunelli, S., Clementi, E., Cossu, G. and Bruni, P. (2007). Sphingosine 1-phosphate mediates proliferation and survival of mesoangioblasts. *Stem Cells* **25**, 1713-9.
- **Draviam, R., Billington, L., Senchak, A., Hoffman, E. P. and Watkins, S. C.** (2001). Confocal analysis of the dystrophin protein complex in muscular dystrophy. *Muscle Nerve* **24**, 262-72.
- **Dubowitz.** (1985). Definition of pathological changes seen in muscle biopsies. In *Dubowitz V, Ed Muscle biopsy. A practical approach. 2nd ed.*, pp. 82-128: London: Baillière Tindall.
  - **Dubowitz, V.** (1992). The muscular dystrophies. *Postgrad Med J* **68**, 500-6.
- **Duchenne, G. B.** (1968). Studies on pseudohypertrophic muscular paralysis or myosclerotic paralysis. *Arch Neurol* **19**, 629-36.
- **Ehmsen, J., Poon, E. and Davies, K.** (2002). The dystrophin-associated protein complex. *J Cell Sci* **115**, 2801-3.
- El Fahime, E., Mills, P., Lafreniere, J. F., Torrente, Y. and Tremblay, J. P. (2002). The urokinase plasminogen activator: an interesting way to improve myoblast migration following their transplantation. *Exp Cell Res* **280**, 169-78.
- El Fahime, E., Torrente, Y., Caron, N. J., Bresolin, M. D. and Tremblay, J. P. (2000). In vivo migration of transplanted myoblasts requires matrix metalloproteinase activity. *Exp Cell Res* **258**, 279-87.
  - **Emery, A. E.** (2002). The muscular dystrophies. *Lancet* **359**, 687-95.
- **Emery, A. E. and Skinner, R.** (1976). Clinical studies in benign (Becker type) X-linked muscular dystrophy. *Clin Genet* **10**, 189-201.
- **Fan, Y., Beilharz, M. W. and Grounds, M. D.** (1996). A potential alternative strategy for myoblast transfer therapy: the use of sliced muscle grafts. *Cell Transplant* **5**, 421-9.
- Farrington-Rock, C., Crofts, N. J., Doherty, M. J., Ashton, B. A., Griffin-Jones, C. and Canfield, A. E. (2004). Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation* 110, 2226-32.
- Feng, J., Yan, J. Y., Buzin, C. H., Sommer, S. S. and Towbin, J. A. (2002). Comprehensive mutation scanning of the dystrophin gene in patients with nonsyndromic X-linked dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **40**, 1120-4.
- 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**, 1528-30.
- Floyd, S. S., Jr., Clemens, P. R., Ontell, M. R., Kochanek, S., Day, C. S., Yang, J., Hauschka, S. D., Balkir, L., Morgan, J., Moreland, M. S. et al. (1998). Ex vivo gene transfer using adenovirus-mediated full-length dystrophin delivery to dystrophic muscles. *Gene Ther* 5, 19-30.
- Friedenstein, A. J., Deriglasova, U. F., Kulagina, N. N., Panasuk, A. F., Rudakowa, S. F., Luria, E. A. and Ruadkow, I. A. (1974). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 2, 83-92.

- **Fuchtbauer, E. M. and Westphal, H.** (1992). MyoD and myogenin are coexpressed in regenerating skeletal muscle of the mouse. *Dev Dyn* **193**, 34-9.
  - Gage, F. H. (2000). Mammalian neural stem cells. Science 287, 1433-8.
- Galkin, V. E., Orlova, A., VanLoock, M. S., Rybakova, I. N., Ervasti, J. M. and Egelman, E. H. (2002). The utrophin actin-binding domain binds F-actin in two different modes: implications for the spectrin superfamily of proteins. *J Cell Biol* 157, 243-51.
- Gallacher, L., Murdoch, B., Wu, D. M., Karanu, F. N., Keeney, M. and Bhatia, M. (2000). Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood* **95**, 2813-20.
- Galmiche, M. C., Koteliansky, V. E., Briere, J., Herve, P. and Charbord, P. (1993). Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood* 82, 66-76.
- Galvez, B. G., Sampaolesi, M., Brunelli, S., Covarello, D., Gavina, M., Rossi, B., Constantin, G., Torrente, Y. and Cossu, G. (2006). Complete repair of dystrophic skeletal muscle by mesoangioblasts with enhanced migration ability. *J Cell Biol* 174, 231-43.
- Garbade, J., Schubert, A., Rastan, A. J., Lenz, D., Walther, T., Gummert, J. F., Dhein, S. and Mohr, F. W. (2005). Fusion of bone marrow-derived stem cells with cardiomyocytes in a heterologous in vitro model. *Eur J Cardiothorac Surg* **28**, 685-91.
- **Gardner-Medwin, D.** (1980). Clinical features and classification of the muscular dystrophies. *Br Med Bull* **36**, 109-15.
- Gaschen, F. P., Hoffman, E. P., Gorospe, J. R., Uhl, E. W., Senior, D. F., Cardinet, G. H., 3rd and Pearce, L. K. (1992). Dystrophin deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats. *J Neurol Sci* 110, 149-59.
- Gaschen, L., Lang, J., Lin, S., Ade-Damilano, M., Busato, A., Lombard, C. W. and Gaschen, F. P. (1999). Cardiomyopathy in dystrophin-deficient hypertrophic feline muscular dystrophy. *J Vet Intern Med* 13, 346-56.
- Gavina, M., Belicchi, M., Rossi, B., Ottoboni, L., Colombo, F., Meregalli, M., Battistelli, M., Forzenigo, L., Biondetti, P., Pisati, F. et al. (2006). VCAM-1 expression on dystrophic muscle vessels has a critical role in the recruitment of human blood-derived CD133+ stem cells after intra-arterial transplantation. *Blood* 108, 2857-66.
- Ghostine, S., Carrion, C., Souza, L. C., Richard, P., Bruneval, P., Vilquin, J. T., Pouzet, B., Schwartz, K., Menasche, P. and Hagege, A. A. (2002). Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation* 106, 1131-6.
- **Gibson, M. C. and Schultz, E.** (1983). Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells. *Muscle Nerve* **6**, 574-80.
- Gimona, M., Djinovic-Carugo, K., Kranewitter, W. J. and Winder, S. J. (2002). Functional plasticity of CH domains. *FEBS Lett* **513**, 98-106.
- **Goebel, H. H.** (2004). The Eighth Meryon Society Lecture read at Worcester College, Oxford on 2 July, 2004. *Neuromuscul Disord* **14**, 822-8.
- Goncalves, M. A., de Vries, A. A., Holkers, M., van de Watering, M. J., van der Velde, I., van Nierop, G. P., Valerio, D. and Knaan-Shanzer, S. (2006a). Human mesenchymal stem cells ectopically expressing full-length dystrophin can complement Duchenne muscular dystrophy myotubes by cell fusion. *Hum Mol Genet* 15, 213-21.
- Goncalves, M. A., Holkers, M., Cudre-Mauroux, C., van Nierop, G. P., Knaan-Shanzer, S., van der Velde, I., Valerio, D. and de Vries, A. A. (2006b). Transduction of myogenic cells by retargeted dual high-capacity hybrid viral vectors: robust dystrophin synthesis in duchenne muscular dystrophy muscle cells. *Mol Ther* 13, 976-86.
- Goodell, M. A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A. S. and Mulligan, R. C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* **183**, 1797-806.

- Goyenvalle, A., Vulin, A., Fougerousse, F., Leturcq, F., Kaplan, J. C., Garcia, L. and Danos, O. (2004). Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* **306**, 1796-9.
- **Gramolini, A. O. and Jasmin, B. J.** (1999). Expression of the utrophin gene during myogenic differentiation. *Nucleic Acids Res* **27**, 3603-9.
- **Granchelli, J. A., Pollina, C. and Hudecki, M. S.** (2000). Pre-clinical screening of drugs using the mdx mouse. *Neuromuscul Disord* **10**, 235-9.
- Gregorevic, P., Plant, D. R., Leeding, K. S., Bach, L. A. and Lynch, G. S. (2002). Improved contractile function of the mdx dystrophic mouse diaphragm muscle after insulin-like growth factor-I administration. *Am J Pathol* **161**, 2263-72.
- Gronthos, S., Zannettino, A. C., Hay, S. J., Shi, S., Graves, S. E., Kortesidis, A. and Simmons, P. J. (2003). Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 116, 1827-35.
- **Gros, J., Manceau, M., Thome, V. and Marcelle, C.** (2005). A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature* **435**, 954-8.
- Grounds, M. D., Garrett, K. L., Lai, M. C., Wright, W. E. and Beilharz, M. W. (1992). Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. *Cell Tissue Res* **267**, 99-104.
- Guerette, B., Asselin, I., Vilquin, J. T., Roy, R. and Tremblay, J. P. (1994). Lymphocyte infiltration following allo- and xenomyoblast transplantation in mice. *Transplant Proc* **26**, 3461-2.
- Guerette, B., Asselin, I., Vilquin, J. T., Roy, R. and Tremblay, J. P. (1995). Lymphocyte infiltration following allo- and xenomyoblast transplantation in mdx mice. *Muscle Nerve* **18**, 39-51.
- Guerette, B., Skuk, D., Celestin, F., Huard, C., Tardif, F., Asselin, I., Roy, B., Goulet, M., Roy, R., Entman, M. et al. (1997a). Prevention by anti-LFA-1 of acute myoblast death following transplantation. *J Immunol* **159**, 2522-31.
- Guerette, B., Wood, K., Roy, R. and Tremblay, J. P. (1997b). Efficient myoblast transplantation in mice immunosuppressed with monoclonal antibodies and CTLA4 Ig. *Transplant Proc* **29**, 1932-4.
- Gussoni, E., Bennett, R. R., Muskiewicz, K. R., Meyerrose, T., Nolta, J. A., Gilgoff, I., Stein, J., Chan, Y. M., Lidov, H. G., Bonnemann, C. G. et al. (2002). Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 110, 807-14.
- **Gussoni, E., Blau, H. M. and Kunkel, L. M.** (1997). The fate of individual myoblasts after transplantation into muscles of DMD patients. *Nat Med* **3**, 970-7.
- 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**, 435-8.
- 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**, 390-4.
- Hagstrom, J. E., Hegge, J., Zhang, G., Noble, M., Budker, V., Lewis, D. L., Herweijer, H. and Wolff, J. A. (2004). A facile nonviral method for delivering genes and siRNAs to skeletal muscle of mammalian limbs. *Mol Ther* 10, 386-98.
- Halevy, O., Piestun, Y., Allouh, M. Z., Rosser, B. W., Rinkevich, Y., Reshef, R., Rozenboim, I., Wleklinski-Lee, M. and Yablonka-Reuveni, Z. (2004). Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal. *Dev Dyn* 231, 489-502.
- Hardiman, O., Sklar, R. M. and Brown, R. H., Jr. (1993). Direct effects of cyclosporin A and cyclophosphamide on differentiation of normal human myoblasts in culture. *Neurology* 43, 1432-4.

- **Harlan, D. M. and Kirk, A. D.** (1999). The future of organ and tissue transplantation: can T-cell costimulatory pathway modifiers revolutionize the prevention of graft rejection? *Jama* **282**, 1076-82.
- **Hawke, T. J. and Garry, D. J.** (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* **91**, 534-51.
- **Hayes, A. and Williams, D. A.** (1998). Contractile function and low-intensity exercise effects of old dystrophic (mdx) mice. *Am J Physiol* **274**, C1138-44.
- Helderman-van den Enden, A. T., Ginjaar, H. B., Kneppers, A. L., Bakker, E., Breuning, M. H. and de Visser, M. (2003). Somatic mosaicism of a point mutation in the dystrophin gene in a patient presenting with an asymmetrical muscle weakness and contractures. *Neuromuscul Disord* 13, 317-21.
- **Heslop, L., Morgan, J. E. and Partridge, T. A.** (2000). Evidence for a myogenic stem cell that is exhausted in dystrophic muscle. *J Cell Sci* **113** ( **Pt 12**), 2299-308.
- **Hodgetts, S. I., Beilharz, M. W., Scalzo, A. A. and Grounds, M. D.** (2000). Why do cultured transplanted myoblasts die in vivo? DNA quantification shows enhanced survival of donor male myoblasts in host mice depleted of CD4+ and CD8+ cells or Nk1.1+ cells. *Cell Transplant* **9**, 489-502.
- **Hoffman, E. P.** (1991). The animals models of Duchenne muscular dystrophy: windows on the pathophysiological consequences of dystrophin deficiency. In *Morrom J and Mooseker M*, (ed. G. J. R.), pp. 113-154. New York: academic Press.
  - Hoffman, E. P. (1993). La myopathie de Duchenne. La Recherche 24, 36-44.
- Hoffman, E. P., Brown, R. H., Jr. and Kunkel, L. M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919-28.
- **Hoffman, E. P. and Dressman, D.** (2001). Molecular pathophysiology and targeted therapeutics for muscular dystrophy. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 465-70.
- Hong, F., Lee, J., Song, J. W., Lee, S. J., Ahn, H., Cho, J. J., Ha, J. and Kim, S. S. (2002). Cyclosporin A blocks muscle differentiation by inducing oxidative stress and inhibiting the peptidyl-prolyl-cis-trans isomerase activity of cyclophilin A: cyclophilin A protects myoblasts from cyclosporin A-induced cytotoxicity. *Faseb J* 16, 1633-5.
- 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, 393-5.
- Howard, M. T., Anderson, C. B., Fass, U., Khatri, S., Gesteland, R. F., Atkins, J. F. and Flanigan, K. M. (2004). Readthrough of dystrophin stop codon mutations induced by aminoglycosides. *Ann Neurol* 55, 422-6.
- Howard, M. T., Shirts, B. H., Petros, L. M., Flanigan, K. M., Gesteland, R. F. and Atkins, J. F. (2000). Sequence specificity of aminoglycoside-induced stop condon readthrough: potential implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 48, 164-9.
  - Howell, J. M. (1999). Is there a future for gene therapy? *Neuromuscul Disord* 9, 102-7.
- Howell, J. M., Fletcher, S., Kakulas, B. A., O'Hara, M., Lochmuller, H. and Karpati, G. (1997). Use of the dog model for Duchenne muscular dystrophy in gene therapy trials. *Neuromuscul Disord* 7, 325-8.
- Huard, J., Acsadi, G., Jani, A., Massie, B. and Karpati, G. (1994a). Gene transfer into skeletal muscles by isogenic myoblasts. *Hum Gene Ther* **5**, 949-58.
- Huard, J., Bouchard, J. P., Roy, R., Labrecque, C., Dansereau, G., Lemieux, B. and Tremblay, J. P. (1991a). Myoblast transplantation produced dystrophin-positive muscle fibres in a 16-year-old patient with Duchenne muscular dystrophy. *Clin Sci (Lond)* 81, 287-8.
- Huard, J., Bouchard, J. P., Roy, R., Malouin, F., Dansereau, G., Labrecque, C., Albert, N., Richards, C. L., Lemieux, B. and Tremblay, J. P. (1992a). Human myoblast transplantation: preliminary results of 4 cases. *Muscle Nerve* 15, 550-60.
- **Huard, J., Cao, B. and Qu-Petersen, Z.** (2003). Muscle-derived stem cells: potential for muscle regeneration. *Birth Defects Res C Embryo Today* **69**, 230-7.

- Huard, J., Labrecque, C., Dansereau, G., Robitaille, L. and Tremblay, J. P. (1991b). Dystrophin expression in myotubes formed by the fusion of normal and dystrophic myoblasts. *Muscle Nerve* **14**, 178-82.
- Huard, J., Roy, R., Bouchard, J. P., Malouin, F., Richards, C. L. and Tremblay, J. P. (1992b). Human myoblast transplantation between immunohistocompatible donors and recipients produces immune reactions. *Transplant Proc* **24**, 3049-51.
- Huard, J., Roy, R., Guerette, B., Verreault, S., Tremblay, G. and Tremblay, J. P. (1994b). Human myoblast transplantation in immunodeficient and immunosuppressed mice: evidence of rejection. *Muscle Nerve* 17, 224-34.
- Hudecki, M. S., Pollina, C. M., Granchelli, J. A., Daly, M. K., Byrnes, T., Wang, J. C. and Hsiao, J. C. (1993). Strength and endurance in the therapeutic evaluation of prednisolone-treated MDX mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **79**, 45-60.
- **Iannaccone**, **S. T. and Nanjiani**, **Z.** (2001). Duchenne Muscular Dystrophy. *Curr Treat Options Neurol* **3**, 105-117.
- **Irintchev, A., Zeschnigk, M., Starzinski-Powitz, A. and Wernig, A.** (1994). Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles. *Dev Dyn* **199**, 326-37.
- Ishikawa, F., Shimazu, H., Shultz, L. D., Fukata, M., Nakamura, R., Lyons, B., Shimoda, K., Shimoda, S., Kanemaru, T., Nakamura, K. et al. (2006). Purified human hematopoietic stem cells contribute to the generation of cardiomyocytes through cell fusion. *Faseb J* 20, 950-2.
- **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**, 14482-6.
- Jacobs, S. C., Bootsma, A. L., Willems, P. W., Bar, P. R. and Wokke, J. H. (1996). Prednisone can protect against exercise-induced muscle damage. *J Neurol* **243**, 410-6.
- Jain, M., DerSimonian, H., Brenner, D. A., Ngoy, S., Teller, P., Edge, A. S., Zawadzka, A., Wetzel, K., Sawyer, D. B., Colucci, W. S. et al. (2001). Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation* **103**, 1920-7.
- **Jankowski, R. J. and Huard, J.** (2004). Establishing reliable criteria for isolating myogenic cell fractions with stem cell properties and enhanced regenerative capacity. *Blood Cells Mol Dis* **32**, 24-33.
- **Johkura, K., Cui, L., Asanuma, K., Okouchi, Y., Ogiwara, N. and Sasaki, K.** (2004). Cytochemical and ultrastructural characterization of growing colonies of human embryonic stem cells. *J Anat* **205**, 247-55.
- 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, 603-16.
- **Judge, L. M. and Chamberlain, J. S.** (2005). Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy: AAV leads the way. *Acta Myol* **24**, 184-93.
- **Karakelides, H. and Sreekumaran Nair, K.** (2005). Sarcopenia of aging and its metabolic impact. *Curr Top Dev Biol* **68**, 123-48.
- **Karpati, G.** (1992). Recent developments in the biology of dystrophin and related molecules. *Curr Opin Neurol Neurosurg* **5**, 615-21.
- Karpati, G., Carpenter, S., Morris, G. E., Davies, K. E., Guerin, C. and Holland, P. (1993). Localization and quantitation of the chromosome 6-encoded dystrophin-related protein in normal and pathological human muscle. *J Neuropathol Exp Neurol* **52**, 119-28.
- Karpati, G., Pouliot, Y., Zubrzycka-Gaarn, E., Carpenter, S., Ray, P. N., Worton, R. G. and Holland, P. (1989). Dystrophin is expressed in mdx skeletal muscle fibers after normal myoblast implantation. *Am J Pathol* 135, 27-32.

- Karpowicz, P., Morshead, C., Kam, A., Jervis, E., Ramunas, J., Cheng, V. and van der Kooy, D. (2005). Support for the immortal strand hypothesis: neural stem cells partition DNA asymmetrically in vitro. *J Cell Biol* 170, 721-32.
- Kassar-Duchossoy, L., Giacone, E., Gayraud-Morel, B., Jory, A., Gomes, D. and Tajbakhsh, S. (2005). Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev* 19, 1426-31.
- **Katagiri, M., Ohtawa, T., Fukunaga, M. and Harada, T.** (1995). Evaluation of bone loss and the serum markers of bone metabolism in patients with hyperparathyroidism. *Surg Today* **25**, 598-604.
- **Kaufman, R. J.** (1999). Correction of genetic disease by making sense from nonsense. *J Clin Invest* **104**, 367-8.
- **Kawada, H. and Ogawa, M.** (2001). Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. *Blood* **98**, 2008-13.
  - **Keating, A.** (2006). Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol* **13**, 419-25.
- Kennedy, J. M., Eisenberg, B. R., Reid, S. K., Sweeney, L. J. and Zak, R. (1988). Nascent muscle fiber appearance in overloaded chicken slow-tonic muscle. *Am J Anat* **181**, 203-15.
- **Kennedy, J. M., Sweeney, L. J. and Gao, L. Z.** (1989). Ventricular myosin expression in developing and regenerating muscle, cultured myotubes, and nascent myofibers of overloaded muscle in the chicken. *Med Sci Sports Exerc* **21**, S187-97.
- Khurana, T. S., Prendergast, R. A., Alameddine, H. S., Tome, F. M., Fardeau, M., Arahata, K., Sugita, H. and Kunkel, L. M. (1995). Absence of extraocular muscle pathology in Duchenne's muscular dystrophy: role for calcium homeostasis in extraocular muscle sparing. *J Exp Med* 182, 467-75.
- Kieny, M., Mauger, A., Chevallier, A. and Pautou, M. P. (1988). Origin and development of avian skeletal musculature. *Reprod Nutr Dev* 28, 673-86.
- **Kim, M., Cooper, D. D., Hayes, S. F. and Spangrude, G. J.** (1998). Rhodamine-123 staining in hematopoietic stem cells of young mice indicates mitochondrial activation rather than dve efflux. *Blood* **91**, 4106-17.
- Kimura, S., Ito, K., Miyagi, T., Hiranuma, T., Yoshioka, K., Ozasa, S., Matsukura, M., Ikezawa, M., Matsuo, M., Takeshima, Y. et al. (2005). A novel approach to identify Duchenne muscular dystrophy patients for aminoglycoside antibiotics therapy. *Brain Dev* 27, 400-5.
- **Kinoshita, I., Huard, J. and Tremblay, J. P.** (1994). Utilization of myoblasts from transgenic mice to evaluate the efficacy of myoblast transplantation. *Muscle Nerve* **17**, 975-80.
- Kinoshita, I., Roy, R., Dugre, F. J., Gravel, C., Roy, B., Goulet, M., Asselin, I. and Tremblay, J. P. (1996). Myoblast transplantation in monkeys: control of immune response by FK506. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 687-97.
- **Kinoshita, I., Vilquin, J. T. and Tremblay, J. P.** (1995). Pretreatment of myoblast cultures with basic fibroblast growth factor increases the efficacy of their transplantation in mdx mice. *Muscle Nerve* **18**, 834-41.
- **Kirschstein, R.** (2001). Scientific Progress and Future Research Directions: NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH.
- **Kissel, J. T., Burrow, K. L., Rammohan, K. W. and Mendell, J. R.** (1991). Mononuclear cell analysis of muscle biopsies in prednisone-treated and untreated Duchenne muscular dystrophy. CIDD Study Group. *Neurology* **41**, 667-72.
- **Kitzmann, M., Carnac, G., Vandromme, M., Primig, M., Lamb, N. J. and Fernandez, A.** (1998). The muscle regulatory factors MyoD and myf-5 undergo distinct cell cycle-specific expression in muscle cells. *J Cell Biol* **142**, 1447-59.
- 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**, 509-17.

- **Koenig, M. and Kunkel, L. M.** (1990). Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem* **265**, 4560-6.
- **Koenig, M., Monaco, A. P. and Kunkel, L. M.** (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* **53**, 219-28.
- **Koh, L. P. and Chao, N. J.** (2004). Umbilical cord blood transplantation in adults using myeloablative and nonmyeloablative preparative regimens. *Biol Blood Marrow Transplant* **10**, 1-22.
- 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, 1056-64.
- Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S. and Sharkis, S. J. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* **105**, 369-77.
- **Kuang, S., Charge, S. B., Seale, P., Huh, M. and Rudnicki, M. A.** (2006). Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *J Cell Biol* **172**, 103-13.
- Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F. and Rudnicki, M. A. (2007). Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* **129**, 999-1010.
- **LaBarge, M. A. and Blau, H. M.** (2002). Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* **111**, 589-601.
- Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I. L. and Grompe, M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6, 1229-34.
- Lagord, C., Soulet, L., Bonavaud, S., Bassaglia, Y., Rey, C., Barlovatz-Meimon, G., Gautron, J. and Martelly, I. (1998). Differential myogenicity of satellite cells isolated from extensor digitorum longus (EDL) and soleus rat muscles revealed in vitro. *Cell Tissue Res* **291**, 455-68.
- **Laule, S. and Bornemann, A.** (2001). Ultrastructural findings at the satellite cell-myofiber border in normal and diseased human muscle biopsy specimens. *Acta Neuropathol (Berl)* **101**, 435-9.
- Law, P. K., Bertorini, T. E., Goodwin, T. G., Chen, M., Fang, Q. W., Li, H. J., Kirby, D. S., Florendo, J. A., Herrod, H. G. and Golden, G. S. (1990). Dystrophin production induced by myoblast transfer therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet* 336, 114-5.
- **Laws, N. and Hoey, A.** (2004). Progression of kyphosis in mdx mice. *J Appl Physiol* **97**, 1970-7.
- **Le Douarin, N.** (1969). [Details of the interphase nucleus in Japanese quail (Coturnix coturnix japonica)]. *Bull Biol Fr Belg* **103**, 435-52.
- **Le Douarin, N. and Barq, G.** (1969). Use of Japanese quail cells as "biological markers" in experimental embryology. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. Série D: Sciences naturelles* **269**, 1543-46.
- Le Moigne, A., Martelly, I., Barlovatz-Meimon, G., Franquinet, R., Aamiri, A., Frisdal, E., Bassaglia, Y., Moraczewski, G. and Gautron, J. (1990). Characterization of myogenesis from adult satellite cells cultured in vitro. *Int J Dev Biol* **34**, 171-80.
- Lee-Pullen, T. F., Bennett, A. L., Beilharz, M. W., Grounds, M. D. and Sammels, L. M. (2004). Superior survival and proliferation after transplantation of myoblasts obtained from adult mice compared with neonatal mice. *Transplantation* **78**, 1172-6.
- 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, 1085-100.
- **Lefaucheur**, **J. P. and Sebille**, **A.** (1995). The cellular events of injured muscle regeneration depend on the nature of the injury. *Neuromuscul Disord* **5**, 501-9.

- **Lin, S. and Burgunder, J. M.** (2000). Utrophin may be a precursor of dystrophin during skeletal muscle development. *Brain Res Dev Brain Res* **119**, 289-95.
- **Lin, S., Gaschen, F. and Burgunder, J. M.** (1998). Utrophin is a regeneration-associated protein transiently present at the sarcolemma of regenerating skeletal muscle fibers in dystrophin-deficient hypertrophic feline muscular dystrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* **57**, 780-90.
- Liu, M., Yue, Y., Harper, S. Q., Grange, R. W., Chamberlain, J. S. and Duan, D. (2005). Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury. *Mol Ther* 11, 245-56.
- **Louboutin, J. P., Fichter-Gagnepain, V., Thaon, E. and Fardeau, M.** (1993). Morphometric analysis of mdx diaphragm muscle fibres. Comparison with hindlimb muscles. *Neuromuscul Disord* **3**, 463-9.
- Love, D. R., Hill, D. F., Dickson, G., Spurr, N. K., Byth, B. C., Marsden, R. F., Walsh, F. S., Edwards, Y. H. and Davies, K. E. (1989). An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* 339, 55-8.
- Love, D. R., Morris, G. E., Ellis, J. M., Fairbrother, U., Marsden, R. F., Bloomfield, J. F., Edwards, Y. H., Slater, C. P., Parry, D. J. and Davies, K. E. (1991). Tissue distribution of the dystrophin-related gene product and expression in the mdx and dy mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3243-7.
- Lu, Q. L., Mann, C. J., Lou, F., Bou-Gharios, G., Morris, G. E., Xue, S. A., Fletcher, S., Partridge, T. A. and Wilton, S. D. (2003). Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med* 9, 1009-14.
- **Ludolph, D. C. and Konieczny, S. F.** (1995). Transcription factor families: muscling in on the myogenic program. *Faseb J* **9**, 1595-604.
- **Lynch, G. S., Cuffe, S. A., Plant, D. R. and Gregorevic, P.** (2001). IGF-I treatment improves the functional properties of fast- and slow-twitch skeletal muscles from dystrophic mice. *Neuromuscul Disord* **11**, 260-8.
- **Maier, F. and Bornemann, A.** (1999). Comparison of the muscle fiber diameter and satellite cell frequency in human muscle biopsies. *Muscle Nerve* **22**, 578-83.
- Majka, S. M., Jackson, K. A., Kienstra, K. A., Majesky, M. W., Goodell, M. A. and Hirschi, K. K. (2003). Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration. *J Clin Invest* 111, 71-9.
- Maroto, M., Reshef, R., Munsterberg, A. E., Koester, S., Goulding, M. and Lassar, A. B. (1997). Ectopic Pax-3 activates MyoD and Myf-5 expression in embryonic mesoderm and neural tissue. *Cell* 89, 139-48.
- **Maruyama, K. and Kanemaki, N.** (1991). Myosin isoform expression in skeletal muscles of turkeys at various ages. *Poult Sci* **70**, 1748-57.
- Matsumura, K., Tome, F. M., Collin, H., Leturcq, F., Jeanpierre, M., Kaplan, J. C., Fardeau, M. and Campbell, K. P. (1994). Expression of dystrophin-associated proteins in dystrophin-positive muscle fibers (revertants) in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* **4**, 115-20.
- Matsumura, K., Tome, F. M., Ionasescu, V., Ervasti, J. M., Anderson, R. D., Romero, N. B., Simon, D., Recan, D., Kaplan, J. C., Fardeau, M. et al. (1993). Deficiency of dystrophin-associated proteins in Duchenne muscular dystrophy patients lacking COOH-terminal domains of dystrophin. *J Clin Invest* 92, 866-71.
- **Mauro, A.** (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* **9**, 493-5.
- **Maves, L. and Schubiger, G.** (2003). Transdetermination in Drosophila imaginal discs: a model for understanding pluripotency and selector gene maintenance. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 472-9.
- **McDouall, R. M., Dunn, M. J. and Dubowitz, V.** (1990). Nature of the mononuclear infiltrate and the mechanism of muscle damage in juvenile dermatomyositis and Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Sci* **99**, 199-217.

- McFarland, D. C., Pesall, J. E. and Gilkerson, K. K. (1993a). The influence of growth factors on turkey embryonic myoblasts and satellite cells in vitro. *Gen Comp Endocrinol* **89**, 415-24.
- McFarland, D. C., Pesall, J. E., Gilkerson, K. K. and Ferrin, N. H. (1995). The response to growth factors of cultured satellite cells derived from turkeys having different growth rates. *Cytobios* 82, 229-38.
- McFarland, D. C., Pesall, J. E., Gilkerson, K. K. and Swenning, T. A. (1993b). Comparison of the proliferation and differentiation of myogenic satellite cells derived from Merriam's and commercial varieties of turkeys. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* **104**, 455-60.
- **McGeachie, J. K. and Grounds, M. D.** (1999). The timing between skeletal muscle myoblast replication and fusion into myotubes, and the stability of regenerated dystrophic myofibres: an autoradiographic study in mdx mice. *J Anat* **194** ( **Pt 2**), 287-95.
- McKinney-Freeman, S. L., Jackson, K. A., Camargo, F. D., Ferrari, G., Mavilio, F. and Goodell, M. A. (2002). Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1341-6.
- McKinney-Freeman, S. L., Majka, S. M., Jackson, K. A., Norwood, K., Hirschi, K. K. and Goodell, M. A. (2003). Altered phenotype and reduced function of muscle-derived hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 31, 806-14.
- **Mehler, M. F.** (2000). Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Res Brain Res Rev* **32**, 277-307.
- Melacini, P., Vianello, A., Villanova, C., Fanin, M., Miorin, M., Angelini, C. and Dalla Volta, S. (1996). Cardiac and respiratory involvement in advanced stage Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 6, 367-76.
- Menasche, P., Hagege, A. A., Vilquin, J. T., Desnos, M., Abergel, E., Pouzet, B., Bel, A., Sarateanu, S., Scorsin, M., Schwartz, K. et al. (2003). Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 41, 1078-83.
- Mendell, J. R., Kissel, J. T., Amato, A. A., King, W., Signore, L., Prior, T. W., Sahenk, Z., Benson, S., McAndrew, P. E., Rice, R. et al. (1995). Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 333, 832-8.
- Metzinger, L., Passaquin, A. C., Leijendekker, W. J., Poindron, P. and Ruegg, U. T. (1995). Modulation by prednisolone of calcium handling in skeletal muscle cells. *Br J Pharmacol* **116**, 2811-6.
- Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A. and McKercher, S. R. (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* **290**, 1779-82.
- Michallet, M., Philip, T., Philip, I., Godinot, H., Sebban, C., Salles, G., Thiebaut, A., Biron, P., Lopez, F., Mazars, P. et al. (2000). Transplantation with selected autologous peripheral blood CD34+Thy1+ hematopoietic stem cells (HSCs) in multiple myeloma: impact of HSC dose on engraftment, safety, and immune reconstitution. *Exp Hematol* 28, 858-70.
- 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, 2773-83.
- Minguell, J. J., Erices, A. and Conget, P. (2001). Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 226, 507-20.
- **Molnar, G., Ho, M. L. and Schroedl, N. A.** (1996). Evidence for multiple satellite cell populations and a non-myogenic cell type that is regulated differently in regenerating and growing skeletal muscle. *Tissue Cell* **28**, 547-56.
- **Molofsky, A. V., Pardal, R. and Morrison, S. J.** (2004). Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 700-7.

- 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**, 646-50.
- 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**, 144-54.
- 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, 2064-7.
- Morgan, J. E. and Partridge, T. A. (2003). Muscle satellite cells. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 1151-6.
- Morosetti, R., Mirabella, M., Gliubizzi, C., Broccolini, A., De Angelis, L., Tagliafico, E., Sampaolesi, M., Gidaro, T., Papacci, M., Roncaglia, E. et al. (2006). MyoD expression restores defective myogenic differentiation of human mesoangioblasts from inclusion-body myositis muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16995-7000.
- 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*.
- Morris, G. E., Nguyen, T. M., Nguyen, T. N., Pereboev, A., Kendrick-Jones, J. and Winder, S. J. (1999). Disruption of the utrophin-actin interaction by monoclonal antibodies and prediction of an actin-binding surface of utrophin. *Biochem J* 337 (Pt 1), 119-23.
- **Moss, F. P.** (1968). The relationship between the dimensions of the fibres and the number of nuclei during normal growth of skeletal muscle in the domestic fowl. *Am J Anat* **122**, 555-63.
- **Moss, F. P. and Leblond, C. P.** (1971). Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *Anat Rec* **170**, 421-35.
- Mouly, V., Aamiri, A., Bigot, A., Cooper, R. N., Di Donna, S., Furling, D., Gidaro, T., Jacquemin, V., Mamchaoui, K., Negroni, E. et al. (2005). The mitotic clock in skeletal muscle regeneration, disease and cell mediated gene therapy. *Acta Physiol Scand* **184**, 3-15.
- Muntoni, F., Fisher, I., Morgan, J. E. and Abraham, D. (2002). Steroids in Duchenne muscular dystrophy: from clinical trials to genomic research. *Neuromuscul Disord* 12 Suppl 1, S162-5.
- **Muntoni, F., Torelli, S. and Ferlini, A.** (2003). Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* **2**, 731-40.
- Murakami, T., Nishi, T., Kimura, E., Goto, T., Maeda, Y., Ushio, Y., Uchino, M. and Sunada, Y. (2003). Full-length dystrophin cDNA transfer into skeletal muscle of adult mdx mice by electroporation. *Muscle Nerve* 27, 237-41.
- Murray, J. M., Davies, K. E., Harper, P. S., Meredith, L., Mueller, C. R. and Williamson, R. (1982). Linkage relationship of a cloned DNA sequence on the short arm of the X chromosome to Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 300, 69-71.
- Nagata, Y., Kobayashi, H., Umeda, M., Ohta, N., Kawashima, S., Zammit, P. S. and Matsuda, R. (2006). Sphingomyelin levels in the plasma membrane correlate with the activation state of muscle satellite cells. *J Histochem Cytochem* 54, 375-84.
- Negrin, R. S., Atkinson, K., Leemhuis, T., Hanania, E., Juttner, C., Tierney, K., Hu, W. W., Johnston, L. J., Shizurn, J. A., Stockerl-Goldstein, K. E. et al. (2000). Transplantation of highly purified CD34+Thy-1+ hematopoietic stem cells in patients with metastatic breast cancer. *Biol Blood Marrow Transplant* 6, 262-71.
- **Negroni, E., Butler-Browne, G. S. and Mouly, V.** (2006). Myogenic stem cells: regeneration and cell therapy in human skeletal muscle. *Pathol Biol (Paris)* **54**, 100-8.
- **Neumeyer, A. M., DiGregorio, D. M. and Brown, R. H., Jr.** (1992). Arterial delivery of myoblasts to skeletal muscle. *Neurology* **42**, 2258-62.

- Nguyen, F., Cherel, Y., Guigand, L., Goubault-Leroux, I. and Wyers, M. (2002). Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal golden retriever puppies. *J Comp Pathol* **126**, 100-8.
- Nguyen, F., Guigand, L., Goubault-Leroux, I., Wyers, M. and Cherel, Y. (2005). Microvessel density in muscles of dogs with golden retriever muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 15, 154-63.
- Nguyen, T. M., Ellis, J. M., Love, D. R., Davies, K. E., Gatter, K. C., Dickson, G. and Morris, G. E. (1991). Localization of the DMDL gene-encoded dystrophin-related protein using a panel of nineteen monoclonal antibodies: presence at neuromuscular junctions, in the sarcolemma of dystrophic skeletal muscle, in vascular and other smooth muscles, and in proliferating brain cell lines. *J Cell Biol* 115, 1695-700.
- Nguyen, T. M., Helliwell, T. R., Simmons, C., Winder, S. J., Kendrick-Jones, J., Davies, K. E. and Morris, G. E. (1995). Full-length and short forms of utrophin, the dystrophin-related protein. *FEBS Lett* **358**, 262-6.
- **Nicolas, N., Gallien, C. L. and Chanoine, C.** (1998). Expression of myogenic regulatory factors during muscle development of Xenopus: myogenin mRNA accumulation is limited strictly to secondary myogenesis. *Dev Dyn* **213**, 309-21.
- Niemeyer, G. P., Hudson, J., Bridgman, R., Spano, J., Nash, R. A. and Lothrop, C. D. (2001). Isolation and characterization of canine hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* **29**, 686-93.
- Nomura, T., Ashihara, E., Tateishi, K., Asada, S., Ueyama, T., Takahashi, T., Matsubara, H. and Oh, H. (2007). Skeletal myosphere-derived progenitor cell transplantation promotes neovascularization in delta-sarcoglycan knockdown cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 352, 668-74.
  - Nonaka, I. (1998). Animal models of muscular dystrophies. Lab Anim Sci 48, 8-17.
- Norwood, F. L., Sutherland-Smith, A. J., Keep, N. H. and Kendrick-Jones, J. (2000). The structure of the N-terminal actin-binding domain of human dystrophin and how mutations in this domain may cause Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Structure* **8**, 481-91.
- **Oberlin, E., Tavian, M., Blazsek, I. and Peault, B.** (2002). Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo. *Development* **129**, 4147-57.
- **Ohlendieck, K. and Campbell, K. P.** (1991a). Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from mdx mice. *J Cell Biol* **115**, 1685-94.
- **Ohlendieck, K. and Campbell, K. P.** (1991b). Dystrophin constitutes 5% of membrane cytoskeleton in skeletal muscle. *FEBS Lett* **283**, 230-4.
- **Ordahl, C. P., Williams, B. A. and Denetclaw, W.** (2000). Determination and morphogenesis in myogenic progenitor cells: an experimental embryological approach. *Curr Top Dev Biol* **48**, 319-67.
- Orlic, D., Fischer, R., Nishikawa, S., Nienhuis, A. W. and Bodine, D. M. (1993). Purification and characterization of heterogeneous pluripotent hematopoietic stem cell populations expressing high levels of c-kit receptor. *Blood* 82, 762-70.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M. et al. (2001a). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**, 701-5.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Limana, F., Jakoniuk, I., Quaini, F., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A. and Anversa, P. (2001b). Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10344-9.
- Oshima, H., Payne, T. R., Urish, K. L., Sakai, T., Ling, Y., Gharaibeh, B., Tobita, K., Keller, B. B., Cummins, J. H. and Huard, J. (2005). Differential myocardial infarct repair with muscle stem cells compared to myoblasts. *Mol Ther* 12, 1130-41.
- **Oustanina, S., Hause, G. and Braun, T.** (2004). Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *Embo J* 23, 3430-9.

- **Palumbo, R. and Bianchi, M. E.** (2004). High mobility group box 1 protein, a cue for stem cell recruitment. *Biochem Pharmacol* **68**, 1165-70.
- Park, O. Y., Ahn, Y., Park, W. S., Lim, J. H., Park, H. W., Kim, J. H., Hong, Y. J., Kim, W., Jeong, M. H., Cho, J. G. et al. (2005). Rapid progression from hypertrophic cardiomyopathy to heart failure in a patient with Becker's muscular dystrophy. *Eur J Heart Fail* 7, 684-8.
- **Partridge, T.** (1991a). Animal models of muscular dystrophy--what can they teach us? *Neuropathol Appl Neurobiol* **17**, 353-63.
  - Partridge, T. (1993). Pathophysiology of muscular dystrophy. Br J Hosp Med 49, 26-36.
- **Partridge, T. A.** (1991b). Invited review: myoblast transfer: a possible therapy for inherited myopathies? *Muscle Nerve* **14**, 197-212.
- 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**, 176-9.
- **Passaquin, A. C., Metzinger, L., Leger, J. J., Warter, J. M. and Poindron, P.** (1993). Prednisolone enhances myogenesis and dystrophin-related protein in skeletal muscle cell cultures from mdx mouse. *J Neurosci Res* **35**, 363-72.
- **Pastoret, C. and Sebille, A.** (1993). Further aspects of muscular dystrophy in mdx mice. *Neuromuscul Disord* **3**, 471-5.
- **Pastoret, C. and Sebille, A.** (1995). mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J Neurol Sci* **129**, 97-105.
- **Patel, K. and Muntoni, F.** (2004). Inducing muscle hypertrophy as a therapeutic strategy for muscular dystrophies. 122nd ENMC International Workshop, Naarden, The Netherlands, 28-30 November 2003. *Neuromuscul Disord* **14**, 519-25.
- **Pavlath, G. K. and Gussoni, E.** (2005). Human myoblasts and muscle-derived SP cells. *Methods Mol Med* **107**, 97-110.
- Pavlath, G. K., Thaloor, D., Rando, T. A., Cheong, M., English, A. W. and Zheng, B. (1998). Heterogeneity among muscle precursor cells in adult skeletal muscles with differing regenerative capacities. *Dev Dyn* **212**, 495-508.
- Payne, T. R., Oshima, H., Sakai, T., Ling, Y., Gharaibeh, B., Cummins, J. and Huard, J. (2005). Regeneration of dystrophin-expressing myocytes in the mdx heart by skeletal muscle stem cells. *Gene Ther* 12, 1264-74.
  - Pearce, J. M. (2000). Gowers' sign. J Neurol Neurosurg Psychiatry 68, 149.
- Peault, 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, 867-77.
- Peister, A., Mellad, J. A., Larson, B. L., Hall, B. M., Gibson, L. F. and Prockop, D. J. (2004). Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* 103, 1662-8.
- **Peng, H. and Huard, J.** (2004). Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. *Transpl Immunol* **12**, 311-9.
- **Perkins, K. J. and Davies, K. E.** (2002). The role of utrophin in the potential therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* **12 Suppl 1**, S78-89.
- **Pernice, W., Guggolz, M. A., Guggolz, M., Beckmann, R. and Wais, U.** (1986). A mathematical analysis of creatine kinase activity in the course of Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* **9**, 333-40.
- **Peters, M. F., Adams, M. E. and Froehner, S. C.** (1997). Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex. *J Cell Biol* **138**, 81-93.
- Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S. and Goff, J. P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* **284**, 1168-70.

- 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 U S A* **90**, 3710-4.
- **Phelan, J. N. and Gonyea, W. J.** (1997). Effect of radiation on satellite cell activity and protein expression in overloaded mammalian skeletal muscle. *Anat Rec* **247**, 179-88.
- **Phinney, D. G., Kopen, G., Isaacson, R. L. and Prockop, D. J.** (1999). Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem* **72**, 570-85.
- **Pimorady-Esfahani, A., Grounds, M. D. and McMenamin, P. G.** (1997). Macrophages and dendritic cells in normal and regenerating murine skeletal muscle. *Muscle Nerve* **20**, 158-66.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. and Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-7.
- **Plant, D. R., Colarossi, F. E. and Lynch, G. S.** (2006). Notexin causes greater myotoxic damage and slower functional repair in mouse skeletal muscles than bupivacaine. *Muscle Nerve* **34**, 577-85.
- **Polakoff, R. J., Morton, A. A., Koch, K. D. and Rios, C. M.** (1998). The psychosocial and cognitive impact of Duchenne's muscular dystrophy. *Semin Pediatr Neurol* **5**, 116-23.
- Politano, L., Nigro, G., Nigro, V., Piluso, G., Papparella, S., Paciello, O. and Comi, L. I. (2003). Gentamicin administration in Duchenne patients with premature stop codon. Preliminary results. *Acta Myol* 22, 15-21.
- **Pons, F., Augier, N., Heilig, R., Leger, J., Mornet, D. and Leger, J. J.** (1990). Isolated dystrophin molecules as seen by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7851-5.
- **Potten, C. S. and Loeffler, M.** (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* **110**, 1001-20.
- **Potten, C. S., Owen, G. and Booth, D.** (2002). Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *J Cell Sci* **115**, 2381-8.
- 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**, 851-64.
- 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**, 1257-67.
- Quenneville, S. P., Chapdelaine, P., Skuk, D., Paradis, M., Goulet, M., Rousseau, J., Xiao, X., Garcia, L. and Tremblay, J. P. (2007). Autologous transplantation of muscle precursor cells modified with a lentivirus for muscular dystrophy: human cells and primate models. *Mol Ther* 15, 431-8.
- **Rafael, J. A., Cox, G. A., Corrado, K., Jung, D., Campbell, K. P. and Chamberlain, J. S.** (1996). Forced expression of dystrophin deletion constructs reveals structure-function correlations. *J Cell Biol* **134**, 93-102.
- **Rando, T. A. and Blau, H. M.** (1994). Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. *J Cell Biol* **125**, 1275-87.
- Rantanen, J., Hurme, T., Lukka, R., Heino, J. and Kalimo, H. (1995). Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. *Lab Invest* 72, 341-7.
- **Rasmusson, I.** (2006). Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* **312**, 2169-79.
- Real, C., Glavieux-Pardanaud, C., Le Douarin, N. M. and Dupin, E. (2006). Clonally cultured differentiated pigment cells can dedifferentiate and generate multipotent progenitors with self-renewing potential. *Dev Biol* 300, 656-69.
- **Recondo, D.** (2001). Pathologie du muscle strié. De la biologie à la thérapie, (ed. D. Recondo), pp. 341.

- Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-Morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S., Mansouri, A., Cumano, A. and Buckingham, M. (2006). Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol* 172, 91-102.
- Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A. and Buckingham, M. (2005). A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* **435**, 948-53.
- Renault, V., Piron-Hamelin, G., Forestier, C., DiDonna, S., Decary, S., Hentati, F., Saillant, G., Butler-Browne, G. S. and Mouly, V. (2000). Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock. *Exp Gerontol* 35, 711-9.
- **Rifai, Z., Welle, S., Moxley, R. T., 3rd, Lorenson, M. and Griggs, R. C.** (1995). Effect of prednisone on protein metabolism in Duchenne dystrophy. *Am J Physiol* **268**, E67-74.
- Rivier, F., Echenne, B., Chaix, Y., Robert, A., Delisle, M. B., Calvas, P. and Mornet, D. (2000). Perturbation in dystrophin-associated glycoprotein complex in a boy with Becker muscular dystrophy. *Brain Dev* 22, 65-8.
- Rivier, F., Robert, A., Royuela, M., Hugon, G., Bonet-Kerrache, A. and Mornet, D. (1999). Utrophin and dystrophin-associated glycoproteins in normal and dystrophin deficient cardiac muscle. *J Muscle Res Cell Motil* **20**, 305-14.
  - Roberts, R. G. (2001). Dystrophins and dystrobrevins. *Genome Biol* 2, REVIEWS3006.
- Roberts, R. G., Coffey, A. J., Bobrow, M. and Bentley, D. R. (1993). Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics* **16**, 536-8.
- **Robin, C., Pflumio, F., Vainchenker, W. and Coulombel, L.** (1999). Identification of lymphomyeloid primitive progenitor cells in fresh human cord blood and in the marrow of nonobese diabetic-severe combined immunodeficient (NOD-SCID) mice transplanted with human CD34(+) cord blood cells. *J Exp Med* **189**, 1601-10.
- **Rochat, A., Kobayashi, K. and Barrandon, Y.** (1994). Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell* **76**, 1063-73.
- Rodriguez, A. M., Pisani, D., Dechesne, C. A., Turc-Carel, C., Kurzenne, J. Y., Wdziekonski, B., Villageois, A., Bagnis, C., Breittmayer, J. P., Groux, H. et al. (2005). Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med* 201, 1397-405.
- Ross, M. T. Grafham, D. V. Coffey, A. J. Scherer, S. McLay, K. Muzny, D. Platzer, M. Howell, G. R. Burrows, C. Bird, C. P. et al. (2005). The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 434, 325-37.
- Roth, S. M., Martel, G. F., Ivey, F. M., Lemmer, J. T., Metter, E. J., Hurley, B. F. and Rogers, M. A. (2000). Skeletal muscle satellite cell populations in healthy young and older men and women. *Anat Rec* **260**, 351-8.
- 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**, 319-26.
- Russell, R. R., 3rd, Nguyen, V. T., Mrus, J. M. and Taegtmeyer, H. (1992). Fasting and lactate unmask insulin responsiveness in the isolated working rat heart. *Am J Physiol* **263**, E556-61.
- **Rybakova, I. N., Amann, K. J. and Ervasti, J. M.** (1996). A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *J Cell Biol* **135**, 661-72.
- **Rybakova, I. N. and Ervasti, J. M.** (1997). Dystrophin-glycoprotein complex is monomeric and stabilizes actin filaments in vitro through a lateral association. *J Biol Chem* **272**, 28771-8.
- **Rybakova, I. N., Patel, J. R. and Ervasti, J. M.** (2000). The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J Cell Biol* **150**, 1209-14.
- **Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Seale, P., Asakura, A. and Rudnicki, M. A.** (1999). Reduced differentiation potential of primary MyoD-/- myogenic cells derived from adult skeletal muscle. *J Cell Biol* **144**, 631-43.
- **Sadoulet-Puccio, H. M. and Kunkel, L. M.** (1996). Dystrophin and its isoforms. *Brain Pathol* **6**, 25-35.

- Sakamoto, M., Yuasa, K., Yoshimura, M., Yokota, T., Ikemoto, T., Suzuki, M., Dickson, G., Miyagoe-Suzuki, Y. and Takeda, S. (2002). Micro-dystrophin cDNA ameliorates dystrophic phenotypes when introduced into mdx mice as a transgene. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 1265-72.
- **Saksela, O.** (1985). Plasminogen activation and regulation of pericellular proteolysis. *Biochim Biophys Acta* **823**, 35-65.
- **Saksela, O. and Rifkin, D. B.** (1988). Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu Rev Cell Biol* **4**, 93-126.
- Sampaolesi, M., Blot, S., D'Antona, G., Granger, N., Tonlorenzi, R., Innocenzi, A., Mognol, P., Thibaud, J. L., Galvez, B. G., Barthelemy, I. et al. (2006). Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* 444, 574-9.
- Sampaolesi, M., Torrente, Y., Innocenzi, A., Tonlorenzi, R., D'Antona, G., Pellegrino, M. A., Barresi, R., Bresolin, N., De Angelis, M. G., Campbell, K. P. et al. (2003). Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science* 301, 487-92.
- **Sarig, R., Baruchi, Z., Fuchs, O., Nudel, U. and Yaffe, D.** (2006). Regeneration and transdifferentiation potential of muscle-derived stem cells propagated as myospheres. *Stem Cells* **24**, 1769-78.
- **Satoh, A., Huard, J., Labrecque, C. and Tremblay, J. P.** (1993). Use of fluorescent latex microspheres (FLMs) to follow the fate of transplanted myoblasts. *J Histochem Cytochem* **41**, 1579-82.
- Schafer, B. W., Czerny, T., Bernasconi, M., Genini, M. and Busslinger, M. (1994). Molecular cloning and characterization of a human PAX-7 cDNA expressed in normal and neoplastic myocytes. *Nucleic Acids Res* **22**, 4574-82.
- 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, 991-8.
- 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**, 945-50.
- Schor, A. M., Allen, T. D., Canfield, A. E., Sloan, P. and Schor, S. L. (1990). Pericytes derived from the retinal microvasculature undergo calcification in vitro. *J Cell Sci* **97** ( **Pt 3**), 449-61
- **Schultz, E.** (1976). Fine structure of satellite cells in growing skeletal muscle. *Am J Anat* **147**, 49-70.
- **Schultz, E.** (1996). Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev Biol* **175**, 84-94.
- **Schultz, E. and Lipton, B. H.** (1982). Skeletal muscle satellite cells: changes in proliferation potential as a function of age. *Mech Ageing Dev* **20**, 377-83.
- **Schultz, E. and McCormick, K. M.** (1994). Skeletal muscle satellite cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **123**, 213-57.
- Seale, P., Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P. and Rudnicki, M. A. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102, 777-86.
- 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., Roses, A. D. et al. (1992). An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics* 13, 115-21.
- Shefer, G., Van de Mark, D. P., Richardson, J. B. and Yablonka-Reuveni, Z. (2006). Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. *Dev Biol* **294**, 50-66.

- Shelton, G. D., Sammut, V., Homma, S., Takayama, S. and Mizisin, A. P. (2004). Myofibrillar myopathy with desmin accumulation in a young Australian Shepherd dog. *Neuromuscul Disord* 14, 399-404.
- Sherwood, R. I., Christensen, J. L., Conboy, I. M., Conboy, M. J., Rando, T. A., Weissman, I. L. and Wagers, A. J. (2004). Isolation of adult mouse myogenic progenitors: functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle. *Cell* 119, 543-54.
- **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.
- **Shinin, V., Gayraud-Morel, B., Gomes, D. and Tajbakhsh, S.** (2006). Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. *Nat Cell Biol* **8**, 677-87.
- Sicinski, P., Geng, Y., Ryder-Cook, A. S., Barnard, E. A., Darlison, M. G. and Barnard, P. J. (1989). The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* **244**, 1578-80.
- Skuk, D., Goulet, M., Roy, B., Chapdelaine, P., Bouchard, J. P., Roy, R., Dugre, F. J., Sylvain, M., Lachance, J. G., Deschenes, L. et al. (2006). Dystrophin expression in muscles of duchenne muscular dystrophy patients after high-density injections of normal myogenic cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 65, 371-86.
- Skuk, D., Goulet, M., Roy, B., Piette, V., Cote, C. H., Chapdelaine, P., Hogrel, J. Y., Paradis, M., Bouchard, J. P., Sylvain, M. et al. (2007). First test of a "high-density injection" protocol for myogenic cell transplantation throughout large volumes of muscles in a Duchenne muscular dystrophy patient: eighteen months follow-up. *Neuromuscul Disord* 17, 38-46.
- **Skuk, D., Goulet, M., Roy, B. and Tremblay, J. P.** (2002). Efficacy of myoblast transplantation in nonhuman primates following simple intramuscular cell injections: toward defining strategies applicable to humans. *Exp Neurol* **175**, 112-26.
- **Skuk, D., Roy, B., Goulet, M. and Tremblay, J. P.** (1999). Successful myoblast transplantation in primates depends on appropriate cell delivery and induction of regeneration in the host muscle. *Exp Neurol* **155**, 22-30.
- **Skuk, D. and Tremblay, J. P.** (1998). Complement deposition and cell death after myoblast transplantation. *Cell Transplant* **7**, 427-34.
- **Skuk, D. and Tremblay, J. P.** (2003). Myoblast transplantation: the current status of a potential therapeutic tool for myopathies. *J Muscle Res Cell Motil* **24**, 285-300.
- **Slauson, D. O. and Cooper, B. J.** (2002). Pathology The study of disease. In *Mechanisms of disease: a textbook of comparative general pathology*, (eds D. O. Slauson and B. J. Cooper), pp. 1-15. Saint Louis: Mosby, Inc.
- **Smith, C. K., 2nd, Janney, M. J. and Allen, R. E.** (1994). Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J Cell Physiol* **159**, 379-85.
- **Smith, G. H.** (2005). Label-retaining epithelial cells in mouse mammary gland divide asymmetrically and retain their template DNA strands. *Development* **132**, 681-7.
- Smith, T. H., Block, N. E., Rhodes, S. J., Konieczny, S. F. and Miller, J. B. (1993). A unique pattern of expression of the four muscle regulatory factor proteins distinguishes somitic from embryonic, fetal and newborn mouse myogenic cells. *Development* 117, 1125-33.
- **Smythe, G. M. and Grounds, M. D.** (2000). Exposure to tissue culture conditions can adversely affect myoblast behavior in vivo in whole muscle grafts: implications for myoblast transfer therapy. *Cell Transplant* **9**, 379-93.
- **Smythe, G. M., Hodgetts, S. I. and Grounds, M. D.** (2000). Immunobiology and the future of myoblast transfer therapy. *Mol Ther* **1**, 304-13.
- **Sogos, V., Curto, M., Reali, C. and Gremo, F.** (2002). Developmentally regulated expression and localization of dystrophin and utrophin in the human fetal brain. *Mech Ageing Dev* **123**, 455-62.

- **Song, L. and Tuan, R. S.** (2004). Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *Faseb J* **18**, 980-2.
- Sonnet, C., Lafuste, P., Arnold, L., Brigitte, M., Poron, F., Authier, F. J., Chretien, F., Gherardi, R. K. and Chazaud, B. (2006). Human macrophages rescue myoblasts and myotubes from apoptosis through a set of adhesion molecular systems. *J Cell Sci* 119, 2497-507.
- Spangrude, G. J., Heimfeld, S. and Weissman, I. L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* **241**, 58-62.
- **Spangrude, G. J. and Johnson, G. R.** (1990). Resting and activated subsets of mouse multipotent hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7433-7.
- Spees, J. L., Olson, S. D., Ylostalo, J., Lynch, P. J., Smith, J., Perry, A., Peister, A., Wang, M. Y. and Prockop, D. J. (2003). Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2397-402.
- **Stauber, W. T. and Smith, C. A.** (1998). Cellular responses in exertion-induced skeletal muscle injury. *Mol Cell Biochem* **179**, 189-96.
- 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**, 536-9.
- Stephan, L., Bouchentouf, M., Mills, P., Lafreniere, J. F. and Tremblay, J. P. (2007). 1,25-dihydroxyvitamin D3 increases the transplantation success of human muscle precursor cells in SCID mice. *Cell Transplant* 16, 391-402.
- **Sutherland, H. J., Lansdorp, P. M., Henkelman, D. H., Eaves, A. C. and Eaves, C. J.** (1990). Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 3584-8.
- Tagliafico, E., Brunelli, S., Bergamaschi, A., De Angelis, L., Scardigli, R., Galli, D., Battini, R., Bianco, P., Ferrari, S., Cossu, G. et al. (2004). TGFbeta/BMP activate the smooth muscle/bone differentiation programs in mesoangioblasts. *J Cell Sci* 117, 4377-88.
- **Tajbakhsh, S., Rocancourt, D., Cossu, G. and Buckingham, M.** (1997). Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell* **89**, 127-38.
- **Takeuchi, Y., Cosset, F. L., Lachmann, P. J., Okada, H., Weiss, R. A. and Collins, M. K.** (1994). Type C retrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and the producer cell. *J Virol* **68**, 8001-7.
- Tamaki, T., Akatsuka, A., Tokunaga, M., Ishige, K., Uchiyama, S. and Shiraishi, T. (1997). Morphological and biochemical evidence of muscle hyperplasia following weight-lifting exercise in rats. *Am J Physiol* **273**, C246-56.
- **Tanabe, Y., Esaki, K. and Nomura, T.** (1986). Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. *Acta Neuropathol (Berl)* **69**, 91-5.
- **Tanaka, E. M.** (2003). Cell differentiation and cell fate during urodele tail and limb regeneration. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 497-501.
- **Tatsumi, R., Anderson, J. E., Nevoret, C. J., Halevy, O. and Allen, R. E.** (1998). HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol* **194**, 114-28.
- Tavian, M., Zheng, B., Oberlin, E., Crisan, M., Sun, B., Huard, J. and Peault, B. (2005). The vascular wall as a source of stem cells. *Ann N Y Acad Sci* **1044**, 41-50.
- **Taylor, J., Muntoni, F., Dubowitz, V. and Sewry, C. A.** (1997). The abnormal expression of utrophin in Duchenne and Becker muscular dystrophy is age related. *Neuropathol Appl Neurobiol* **23**, 399-405.
- **Taylor, S. M. and Jones, P. A.** (1982). Changes in phenotypic expression in embryonic and adult cells treated with 5-azacytidine. *J Cell Physiol* **111**, 187-94.

- **Teijeira, S., Teijeiro, A., Fernandez, R. and Navarro, C.** (1998). Subsarcolemmal expression of utrophin in neuromuscular disorders: an immunohistochemical study of 80 cases. *Acta Neuropathol (Berl)* **96**, 481-6.
- Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D. M., Nakano, Y., Meyer, E. M., Morel, L., Petersen, B. E. and Scott, E. W. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416, 542-5.
- **Thanh, L. T., Nguyen, T. M., Helliwell, T. R. and Morris, G. E.** (1995). Characterization of revertant muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy, using exon-specific monoclonal antibodies against dystrophin. *Am J Hum Genet* **56**, 725-31.
- Tinsley, J. M., Blake, D. J., Roche, A., Fairbrother, U., Riss, J., Byth, B. C., Knight, A. E., Kendrick-Jones, J., Suthers, G. K., Love, D. R. et al. (1992). Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature* **360**, 591-3.
- 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, 182-95.
- Torrente, Y., Camirand, G., Pisati, F., Belicchi, M., Rossi, B., Colombo, F., El Fahime, M., Caron, N. J., Issekutz, A. C., Constantin, G. et al. (2003). Identification of a putative pathway for the muscle homing of stem cells in a muscular dystrophy model. *J Cell Biol* 162, 511-20.
- 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 musclederived CD34(+)Sca-1(+) stem cells restores dystrophin in mdx mice. *J Cell Biol* 152, 335-48.
- **Torres, L. F. and Duchen, L. W.** (1987). The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain* **110** ( **Pt 2**), 269-99.
- **Towbin, J. A.** (1998). The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 131-9.
- **Towbin, J. A. and Bowles, N. E.** (2000). Genetic abnormalities responsible for dilated cardiomyopathy. *Curr Cardiol Rep* **2**, 475-80.
  - **Towbin, J. A. and Bowles, N. E.** (2002). The failing heart. *Nature* **415**, 227-33.
- **Toyota, N. and Shimada, Y.** (1984). Isoforms of troponin during regeneration of chicken skeletal muscle fibers after cold injury. *Cell Tissue Res* **236**, 549-54.
- Tremblay, J. P., Bouchard, J. P., Malouin, F., Theau, D., Cottrell, F., Collin, H., Rouche, A., Gilgenkrantz, S., Abbadi, N., Tremblay, M. et al. (1993). Myoblast transplantation between monozygotic twin girl carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 3, 583-92.
- **Uchida, N. and Weissman, I. L.** (1992). Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1lo Lin- Sca-1+ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *J Exp Med* **175**, 175-84.
- **Urish, K., Kanda, Y. and Huard, J.** (2005). Initial failure in myoblast transplantation therapy has led the way toward the isolation of muscle stem cells: potential for tissue regeneration. *Curr Top Dev Biol* **68**, 263-80.
- **Valentine**, **B. A.** (2007). Skeletal muscle. In *McGavin & Zachary*, *Pathologic basis of veterinary disease*, (ed. M. Elsevier), pp. 973. St Louis, Missouri.
- 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 (Berl)* **71**, 301-10.
- 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. and Gallagher**, **E. A.** (1989). Intracellular calcium in canine muscle biopsies. *J Comp Pathol* **100**, 223-30.

- Valentine, B. A., Winand, N. J., Pradhan, D., Moise, N. S., de Lahunta, A., Kornegay, J. N. and Cooper, B. J. (1992). Canine X-linked muscular dystrophy as an animal model of Duchenne muscular dystrophy: a review. *Am J Med Genet* 42, 352-6.
- Vandebrouck, C., Imbert, N., Duport, G., Cognard, C. and Raymond, G. (1999). The effect of methylprednisolone on intracellular calcium of normal and dystrophic human skeletal muscle cells. *Neurosci Lett* **269**, 110-4.
- Vannucchi, M. G., Corsani, L., Giovannini, M. G. and Faussone-Pellegrini, M. S. (2001). Expression of dystrophin in the mouse myenteric neurones. *Neurosci Lett* **300**, 120-4.
- Vannucchi, M. G., Zardo, C., Corsani, L. and Faussone-Pellegrini, M. S. (2002). Interstitial cells of Cajal, enteric neurons, and smooth muscle and myoid cells of the murine gastrointestinal tract express full-length dystrophin. *Histochem Cell Biol* 118, 449-57.
- Vater, R., Young, C., Anderson, L. V., Lindsay, S., Blake, D. J., Davies, K. E., Zuellig, R. and Slater, C. R. (1998). Utrophin mRNA expression in muscle is not restricted to the neuromuscular junction. *Mol Cell Neurosci* 10, 229-42.
- **Volonte, D., Liu, Y. and Galbiati, F.** (2005). The modulation of caveolin-1 expression controls satellite cell activation during muscle repair. *Faseb J* **19**, 237-9.
- Vose, J. M., Bierman, P. J., Lynch, J. C., Atkinson, K., Juttner, C., Hanania, C. E., Bociek, G. and Armitage, J. O. (2001). Transplantation of highly purified CD34+Thy-1+ hematopoietic stem cells in patients with recurrent indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 7, 680-7.
- Wakitani, S., Saito, T. and Caplan, A. I. (1995). Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 18, 1417-26.
- Wang, J. F., Forst, J., Schroder, S. and Schroder, J. M. (1999). Correlation of muscle fiber type measurements with clinical and molecular genetic data in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 9, 150-8.
- Watt, D. J., Karasinski, J., Moss, J. and England, M. A. (1994). Migration of muscle cells. *Nature* **368**, 406-7.
- Watt, D. J., Lambert, K., Morgan, J. E., Partridge, T. A. and Sloper, J. C. (1982). Incorporation of donor muscle precursor cells into an area of muscle regeneration in the host mouse. *J Neurol Sci* **57**, 319-31.
- Watt, D. J., Morgan, J. E. and Partridge, T. A. (1984). Use of mononuclear precursor cells to insert allogeneic genes into growing mouse muscles. *Muscle Nerve* 7, 741-50.
- Wehling-Henricks, M., Lee, J. J. and Tidball, J. G. (2004). Prednisolone decreases cellular adhesion molecules required for inflammatory cell infiltration in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Neuromuscul Disord* 14, 483-90.
- Wilton, S. D., Dye, D. E., Blechynden, L. M. and Laing, N. G. (1997). Revertant fibres: a possible genetic therapy for Duchenne muscular dystrophy? *Neuromuscul Disord* 7, 329-35.
- Winand, N. J., Edwards, M., Pradhan, D., Berian, C. A. and Cooper, B. J. (1994). Deletion of the dystrophin muscle promoter in feline muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 4, 433-45.
- Winitsky, S. O., Gopal, T. V., Hassanzadeh, S., Takahashi, H., Gryder, D., Rogawski, M. A., Takeda, K., Yu, Z. X., Xu, Y. H. and Epstein, N. D. (2005). Adult murine skeletal muscle contains cells that can differentiate into beating cardiomyocytes in vitro. *PLoS Biol* 3, e87.
- **Womble, M. D. and Bonner, P. H.** (1980). Developmental fate of a distinct class of chick myoblasts after transplantation of cloned cells into quail embryos. *J Embryol Exp Morphol* **58**, 119-30.
- Yablonka-Reuveni, Z., Quinn, L. S. and Nameroff, M. (1987). Isolation and clonal analysis of satellite cells from chicken pectoralis muscle. *Dev Biol* 119, 252-9.
- **Yablonka-Reuveni, Z. and Rivera, A. J.** (1994). Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev Biol* **164**, 588-603.

- Yablonka-Reuveni, Z., Rudnicki, M. A., Rivera, A. J., Primig, M., Anderson, J. E. and Natanson, P. (1999). The transition from proliferation to differentiation is delayed in satellite cells from mice lacking MyoD. *Dev Biol* 210, 440-55.
- Yin, A. H., Miraglia, S., Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A. G., Olweus, J., Kearney, J. and Buck, D. W. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **90**, 5002-12.
- Ying, Q. L., Nichols, J., Evans, E. P. and Smith, A. G. (2002). Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416, 545-8.
- Yoshida, M., Suzuki, A., Yamamoto, H., Noguchi, S., Mizuno, Y. and Ozawa, E. (1994). Dissociation of the complex of dystrophin and its associated proteins into several unique groups by n-octyl beta-D-glucoside. *Eur J Biochem* 222, 1055-61.
- Yoshida, N., Yoshida, S., Koishi, K., Masuda, K. and Nabeshima, Y. (1998). Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. *J Cell Sci* 111 ( Pt 6), 769-79.
- Zalaudek, I., Bonelli, R. M., Koltringer, P., Reisecker, F. and Wagner, K. (1999). Early diagnosis in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet* **353**, 1975.
- Zambidis, E. T., Oberlin, E., Tavian, M. and Peault, B. (2006). Blood-forming endothelium in human ontogeny: lessons from in utero development and embryonic stem cell culture. *Trends Cardiovasc Med* **16**, 95-101.
- Zammit, P. S., Carvajal, J. J., Golding, J. P., Morgan, J. E., Summerbell, D., Zolnerciks, J., Partridge, T. A., Rigby, P. W. and Beauchamp, J. R. (2004a). Myf5 expression in satellite cells and spindles in adult muscle is controlled by separate genetic elements. *Dev Biol* 273, 454-65.
- Zammit, P. S., Golding, J. P., Nagata, Y., Hudon, V., Partridge, T. A. and Beauchamp, J. R. (2004b). Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J Cell Biol* 166, 347-57.
- **Zammit, P. S., Partridge, T. A. and Yablonka-Reuveni, Z.** (2006). The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J Histochem Cytochem* **54**, 1177-91.
- Zeng, C., Pesall, J. E., Gilkerson, K. K. and McFarland, D. C. (2002). The effect of hepatocyte growth factor on turkey satellite cell proliferation and differentiation. *Poult Sci* 81, 1191-8.
- Zhang, G., Ludtke, J. J., Thioudellet, C., Kleinpeter, P., Antoniou, M., Herweijer, H., Braun, S. and Wolff, J. A. (2004). Intraarterial delivery of naked plasmid DNA expressing full-length mouse dystrophin in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* 15, 770-82.
- 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, 1025-34.
- Zhou, S., Schuetz, J. D., Bunting, K. D., Colapietro, A. M., Sampath, J., Morris, J. J., Lagutina, I., Grosveld, G. C., Osawa, M., Nakauchi, H. et al. (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 7, 1028-34.
- Zubrzycka-Gaarn, E. E., Bulman, D. E., Karpati, G., Burghes, A. H., Belfall, B., Klamut, H. J., Talbot, J., Hodges, R. S., Ray, P. N. and Worton, R. G. (1988). The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature* 333, 466-9.
- **Zwaka, T. P. and Thomson, J. A.** (2005). Differentiation of human embryonic stem cells occurs through symmetric cell division. *Stem Cells* **23**, 146-9.

Les cellules souches dérivées du muscle (MDSC) : isolement dans deux modèles gros animaux et évaluation comme candidates à la thérapie de la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD)

Les approches thérapeutiques de la DMD basées sur la transplantation de myoblastes se sont heurtées à un faible taux de survie cellulaire et une dispersion limitée des cellules. L'identification de cellules souches au sein de tissus adultes et la définition de leur potentiel myogénique ont ouvert de nouvelles perspectives.

Dans un 1<sup>er</sup> temps, nous avons utilisé les propriétés d'adhérence des cellules dérivées du muscle afin d'isoler dans un modèle aviaire des cellules progénitrices résidantes du muscle distinctes des myoblastes, les LAC (late adherent cells). En utilisant la technique de préplating, nous avons montré, comme cela avait été démontré chez la souris, qu'une fraction marginale de cellules présente un défaut initial d'adhérence à une matrice collagénique et que celle-ci se compose de cellules immatures ou peu engagées dans le programme myogénique. De plus, nous avons démontré que ce défaut ne peut être attribué à la méthodologie employée et que ces cellules ne sont pas générées *in vitro*.

Dans un 2<sup>nd</sup> temps, nous avons mis en évidence dans un modèle canin que les propriétés de quiescence, de forte capacité de prolifération, de faible capacité de fusion *in vitro*, de phénotype et de multipotence faisaient des LAC des cellules souches musculaires : les MDSC (*Muscle Derived Stem Cells*). Après injection intramusculaire chez le chien GRMD (*Golden Retriever Muscular Dystrophy*), modèle cliniquement relevant de la DMD, les MDSC participent à la formation de fibres musculaires, permettent une restauration de la dystrophine, et génèrent des cellules satellites. L'ensemble de ces caractéristiques positionne les MDSC comme des candidates intéressantes pour la thérapie de la DMD.

Muscle-derived stem cells (MDSC): isolation in two large animal models and evaluation of

their potential in Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) therapy

Therapeutic approaches for Duchenne Muscular Dystrophy by myoblast transplantation have been

hindered by poor survival rates and the limited spread of the injected cells. Stem cell identification in adult

tissues and the definition of their myogenic potential have open new prospects.

First, we used the muscle-derived cell's adhesion properties in an avian model to isolate progenitor cells

residing in skeletal muscle and that are distinct from myoblasts: the LAC (Late-Adherent Cells). Using the

preplating technique, we showed that a marginal cell fraction displays an initial adhesion defect to collagen

matrix and that it is composed of cells poorly committed in myogenic program and immature progenitor

cells, as this has been previously described in mice model. Also, we demonstrated that this defect could not

be attributed to the methodological approach and that the LAC are not generated in vitro by myoblasts.

Second, we showed in canine model that the LAC are characterized by an initial quiescent status, a high

in vitro proliferation rate as well as a low fusion ability, a phenotype and a multi-lineage differentiation

potential that defined them as muscle stem cells: the MDSC (Muscle Derived Stem Cells). After

intramuscular injection in dystrophic GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy) dogs that represent

clinically relevant animal model for DMD, we established that MDSC are able to participate in muscle fiber

formation, to allow recovery of dystrophin expression and to generate satellite cells. Collectively, these

results qualify MDSC as potential candidates for future cell therapy for DMD.

Mots clés : muscle squelettique ; Dystrophie Musculaire de Duchenne ; cellules satellites ; thérapie

cellulaire; cellules souches adultes; adhérence; Muscle derived Stem Cells; Preplating

Discipline : Biologie, Médecine, Santé : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

213